

Titre: Déphosphatation biologique et dénitrification d'effluents piscicoles marin et dulcicole par réacteur séquentiel à lit mobile avec bac de concentrat
Title:

Auteur: Bertrand Vallet
Author:

Date: 2007

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Vallet, B. (2007). Déphosphatation biologique et dénitrification d'effluents piscicoles marin et dulcicole par réacteur séquentiel à lit mobile avec bac de concentrat [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/7989/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/7989/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche:
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉPHOSPHATATION BIOLOGIQUE ET DÉNITRIFICATION
D'EFFLUENTS PISCICOLES MARIN ET DULCICOLE
PAR RÉACTEUR SÉQUENTIEL À LIT MOBILE
AVEC BAC DE CONCENTRAT

BERTRAND VALLET
DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CIVIL)
OCTOBRE 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-36950-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-36950-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉPHOSPHATATION BIOLOGIQUE ET DÉNITRIFICATION
D'EFFLUENTS PISCICOLES MARIN ET DULCICOLE
PAR RÉACTEUR SÉQUENTIEL À LIT MOBILE
AVEC BAC DE CONCENTRAT

présenté par: VALLET Bertrand

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. BARBEAU Benoit, Ph.D., président

M. COMEAU Yves, Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme. KY Caroline, M.Sc.A., membre

DÉDICACE

Je dédicace ce mémoire à toute ma famille qui se trouve bien loin mais qui m'a toujours encouragé à persévérer. Cette maîtrise devait être un changement de cap et sans ma famille, je ne sais pas si j'aurais pu prendre les décisions qui s'imposaient.

Ce mémoire est la marque de ce virage.

Je vous aime.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord M. Yves Comeau de m'avoir permis de revenir à Montréal pour effectuer cette maîtrise sur un sujet si passionnant et si vaste.

Je remercie également le CRSNG pour l'appui financier qui m'a été fourni et qui a grandement facilité l'accomplissement de ce projet.

Je remercie le personnel du Biodôme qui a toujours été présent quand une fuite se présentait, qu'un bassin débordait ou qu'un 5@7 s'organisait.

Je remercie M. Denis Bouchard qui a su accueillir, toujours avec le sourire, les nombreuses séries d'échantillons que je lui amenais et les analyser.

Merci ensuite à M. Serge Parent qui, par un courriel de courtoisie, a réveillé l'étudiant qui se mourait en moi et sans qui ce projet aurait sans doute perdu de sa saveur.

Je remercie également tous mes amis d'ici et d'ailleurs qui sont toujours, où qu'ils soient, une bouffée d'oxygène quand le moral n'est pas au plus haut mais qui sont trop nombreux pour que je les nomme tous sans risquer d'en oublier (non ce n'est pas de la paresse, ils sont vraiment trop nombreux).

Enfin je remercie mes parents qui ont toujours été avec moi, dans les bons moments comme dans les difficiles.

Et comment ne pas remercier le Canadien de Montréal, ce club de hockey qui m'a fait passer de si belles soirées entre amis et qui a permis de me découvrir une passion toute québécoise.

RÉSUMÉ

Le circuit partiellement fermé (CPF) est un moyen permettant aux piscicultures de réduire la consommation d'eau. Néanmoins la concentration de pollutions dissoutes dans l'eau amène des problèmes sanitaires et environnementaux. Afin de réduire les concentrations en phosphate et en nitrate de ce type de circuits, un procédé original en biofilm opéré par réacteur séquentiel à lit mobile avec bac de concentrat a été développé. Ce procédé vise à utiliser une biomasse déphosphatante dénitrifiante pour transférer les phosphates de l'eau à traiter à une eau extérieure au CPF, maintenue anaérobie, et stockée dans un bac adjacent au réacteur biologique. Après une modélisation du procédé à l'aide du modèle ASM3 et du module BioP de l'EAWAG pour valider la mise en œuvre, une première expérience a été réalisée pour traiter l'eau du Saint-Laurent Marin, le mésocosme d'eau salée reproduisant l'estuaire et le golfe du fleuve Saint-Laurent au Biodôme de Montréal. Cette première expérience n'a pas permis de faire croître un biofilm déphosphatant comme le prévoyait la modélisation, possiblement à cause de la très forte concentration en calcium présente dans l'eau. Pour vérifier que le procédé n'était pas en cause, une deuxième expérience réalisée à l'aide d'un effluent synthétique en eau douce a cette fois présenté une capacité d'épuration du phosphore d'environ 20%, abaissant au maximum la concentration de 4,7 mg P/L à partir d'un effluent à 14,2 mg P/L. Ces performances restent inférieures de celles évoquées dans la littérature pour des procédés semblables mais plusieurs paramètres semblent pouvoir encore être améliorés pour permettre une meilleure performance de ce procédé.

ABSTRACT

The partially closed circuit (PCC) is a means of reducing water consumption by fish farms. However, the accumulation of dissolved pollutants leads to sanitary and environmental problems. To reduce the concentrations of nitrate and phosphate in such systems, an original biofilm process operated as a sequencing moving bed reactor coupled to a concentrate stock tank has been developed. This process aims to use a phosphorus-removing and denitrifying biomass to transfer phosphates from the water to be treated to water external to the CPF. This external water is maintained under anaerobic conditions and is stocked in a tank adjacent to the biological reactor. After modeling the process using ASM3 and the EAWAG BioP module to validate the implementation of the system, a first experiment was conducted to treat water from the St. Lawrence Mesocosm (SLM). This salt water ecosystem reproduces the estuary and golf of the St. Lawrence River at the Montreal Biodome. This experiment did not allow the growth of a phosphorus-removing biomass as had been predicted by modeling, possibly because of the high calcium concentration in the water. To confirm that the process itself was not at issue, a second experiment using a synthetic fresh water effluent yielded a 20% phosphorus removal, lowering the concentration from 14.2 mg P/L to 4.7 mg P/L. These performances remain inferior to those mentioned in the literature for similar systems but several parameters seem to be improved to enable better performance of this process.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iv
REMERCIEMENTS.....	v
RÉSUMÉ.....	vi
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiv
LISTE DES ANNEXES	xv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique des piscicultures en circuit fermé.....	1
1.2 Objectifs de recherche.....	3
1.2.1 Historique des travaux de dépollution du SLM	3
1.2.2 Développement d'un procédé de déphosphatation biologique par bactéries déphosphatantes dénitrifiantes	4
1.2.3 Hypothèse et objectifs de recherche.....	6
1.3 Organisation du mémoire.....	6
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	8
2.1 Conditions du SLM.....	8
2.2 Déphosphatation biologique et dénitrification	9
2.2.1 Un groupe de bactéries concurrentes	9
2.2.2 Le choix de la source de carbone	10
2.2.3 Conditions favorisant les organismes déphosphatants dénitrifiants.....	10
2.3 Impact des conditions environnementales sur la déphosphatation biologique par ODAP	11
2.3.1 Effet de la température	11
2.3.2 Effet du pH	12

2.3.3	Effet des nitrites	13
2.4	Réacteur à lit mobile	13
CHAPITRE 3 MATERIEL ET METHODES		15
3.1	Procédé de traitement	15
3.1.1	Principe de fonctionnement du procédé	15
3.1.2	Description du banc d'essai	16
3.1.3	Méthodologie en eau de mer	17
3.1.4	Méthodologie en eau douce	21
3.1.5	Calibration du banc d'essai	23
3.2	Modélisation.....	24
3.3	Respirométrie	28
3.4	Suivi de cycle	29
3.5	Déterminations analytiques.....	29
3.5.1	Mesure de la biomasse	29
3.5.2	Analyses chimiques.....	30
CHAPITRE 4 BIOLOGICAL PHOSPHORUS REMOVAL IN A SEQUENCING MOVING BED BIOFILM REACTOR IN SEAWATER AND FRESHWATER		32
4.1	Abstract	32
4.2	Introduction	33
4.3	Material and Method	36
4.3.1	Experimental setup.....	36
4.3.2	Theoretical approach	39
4.3.3	Set-up of mathematical model	41
4.3.4	Physico-chemical analyses.....	43
4.3.5	DNA extraction and PCR.....	43
4.4	Results	44
4.4.1	Modeling	44
4.4.2	Experimental results.....	45

4.5	Discussion	50
4.5.1	Seawater run.....	50
4.5.2	Performance in freshwater	51
4.6	Conclusions	52
4.7	Acknowledgements	53
CHAPITRE 5 RESULTATS COMPLEMENTAIRES		54
5.1	Respirométrie en eau de mer.....	54
5.2	Modélisation d'un cycle avec le module ASM3 et le module BioP de l'EAWAG	56
5.3	Caractérisation de la biomasse	58
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE INTEGRÉE.....		61
6.1	Impossible de réussir la déphosphatation en eau de mer ?.....	61
6.2	Comparaison modélisation/expérimentation.....	63
6.3	Perspectives.....	66
CHAPITRE 7 CONCLUSIONS		68
RÉFÉRENCES.....		70
ANNEXES.....		78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Caractéristique de l'eau du SLM lors des expériences (* : valeurs adaptées des données par Aquarium System Inc. pour une salinité de 28ppm).	9
Tableau 3-1 : Minutage des phases d'un cycle pour les deux périodes l'expérimentation en eau de mer	19
Tableau 3-2 : Minutage des phases d'un cycle pour l'expérimentation en eau douce...	21
Tableau 3-3 : Définition des paramètres modélisés pour SLM, BR et ST	25
Tableau 3-4 : Définition des paramètres modélisés pour les contrôleurs C1, C2 et C3	28
Tableau 4-1 : Characteristics of seawater (SLM; n=27) and synthetic freshwater (n=14) based on (*) average values of Montreal freshwater analyzed by the drinking water treatment plant laboratory and (**) values given by Aquarium Systems for a 28 ppm salinity	38
Tableau 4-2 : Description of the cycle phases and duration for corresponding runs and periods	39
Tableau 5-1 : Ratio Prelargué/DCOassimilée et DCOassimilée/Prelargué observés lors des suivis de cycles	60

LISTE DES FIGURES

Fig. 1-1 : Évolution des concentrations de nitrate et de phosphate dans le SLM depuis l'ouverture du Biodôme en 1992.	2
Fig. 3-1: Schéma d'un réacteur à lit mobile	16
Fig. 3-2: Schéma du banc d'essai en eau de mer	18
Fig. 3-3: Schéma du banc d'essai en eau douce	22
Fig. 3-4 : Schéma d'implantation des différents objets de la modélisation dans WEST®	26
Fig. 3-5 : Diagramme de fonctionnement du contrôleur C1.	27
Fig. 4-1 : Experimental setup.	37
Fig. 4-2 : Expected changes in parameters during SMBBR phases.	41
Fig. 4-3 : Phase controller for the mathematical model.	42
Fig. 4-4 : Changes in simulated biomass components from the experimental state at the beginning of period 1-B until quasi steady state.	45
Fig. 4-5 : Changes in experimental biomass during runs 1 and 2 in R1 and R2.	46
Fig. 4-6 : Mass of phosphorus released in the stock tank per cycle based on the final phosphate concentration in the stock tank before water changing divided by the number of cycles carried out.	47
Fig. 4-7 : Concentrations of nitrate, phosphate and oxygen in bioreactor during a typical cycle of the run 2 (freshwater)	48
Fig. 4-8 : Phosphorus mass balance for R1 and R2 during freshwater run. Percents are expressed as the mean of the two reactors	49
Fig. 5-1 : Consommation d'oxygène pour le SLM et le concentrat avec et sans source d'azote ajoutée	55
Fig. 5-2 : Concentrations prédites par le modèle en phosphate, nitrate, oxygène et acétate modélisé durant un cycle après avoir atteint le régime permanent.	57

Fig. 5-3 : Concentration en phosphates accumulés dans le bac de concentrat au cours d'une semaine après avoir atteint le régime permanent tel que prédite par le modèle.	58
---	----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ASM3 :	<i>Activated Sludge Model n°3</i>
BioPN :	Déphosphatation Biologique Dénitriphante
BPR :	<i>Biological Phosphorus Removal</i>
CPF :	Circuit Partiellement Fermé
ODAP :	Organismes Dénitrifiants Accumulateurs de Polyphosphates
EAWAG :	Institut fédéral pour l'aménagement, l'épuration et la protection des eaux
EBPR :	<i>Enhanced Biological Phosphorus Removal</i>
IVT :	Indice de (matières) Volatiles Total
MBBR :	<i>Moving Bed Biofilm Reactor</i>
MES :	Matière En Suspension
MIT :	Matières Inorganiques Totales
MT :	Matières Totales
MVT :	Matières Volatiles Totales
MVES :	Matières volatiles en suspension
OAP :	Organisme Accumulateur de Polyphosphates ; <i>Polyphosphate Accumulating Organism (PAO)</i>
PHA :	Polyhydroxyalcanoates, composés de polyhydroxybutyrate (PHB) et polyhydroxyvalérate (PHV).
Poly-P :	Polyphosphates
R1 et R2 :	Réacteur n°1 et réacteur n°2
SLM :	Saint-Laurent Marin ; <i>St. Lawrence Mesocosm</i>
STEP :	STation d'EPuration
STRADDAQ :	STRATégie de Développement Durable de l'Aquaculture en eau douce au Québec

LISTE DES ANNEXES

(sur CD-ROM)

ANNEXE A - TEST DE CALIBRATION DES BACS DE CONCENTRAT

ANNEXE B - PROGRAMME DES CONTROLEURS

ANNEXE C - RAPPORT D'ANALYSE DU PRECIPITE PAR LE CENTRE DE
CARACTERISATION MICROSCOPIQUE DES MATERIAUX (CM) 2

ANNEXE D - FICHIERS MODELISATION

ANNEXE E - FICHIERS DONNEES PILOTE

ANNEXE F - BILAN DE MASSE P

ANNEXE G - BIOMASSE

ANNEXE H - P RELARGUE PAR CYCLE

ANNEXE I - SUIVI DE CYCLES

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Problématique des piscicultures en circuit fermé

Le circuit partiellement fermé (CPF) permet aux piscicultures de réduire la consommation d'eau. Néanmoins la concentration de pollutions dissoutes à l'intérieur du circuit pose des problèmes sanitaires et environnementaux. L'azote ammoniacal n'étant pas toléré par les poissons, un biofiltre nitrifiant est généralement mis en place pour transformer l'ammoniac en nitrate. Ce dernier n'a de conséquence pour la santé des poissons qu'à des concentrations élevées (100 mg N-NO₃/L). D'autre part la nourriture et les déjections des poissons entraînent des charges élevées qui dépassent l'objectif de réduction de la Stratégie de développement durable de l'aquaculture en eau douce au Québec (STRADDAQ) qui est de 4,5 kg P rejeté par tonne de poisson produite. Il est alors nécessaire de développer des procédés de traitement qui permettent d'abaisser les concentrations en pollution au sein du CPF.

Le Biodôme de Montréal possède un mésocosme marin, appelé Saint-Laurent marin (SLM) qui représente l'estuaire maritime et le golfe du Saint-Laurent. Ce mésocosme fonctionne en circuit fermé et contient 3 250 m³ d'eau de mer. L'accumulation de pollution apportée par les aliments, les animaux vivants dans et au-dessus (oiseaux) de l'aquarium rend cet écosystème comparable à une pisciculture en circuit fermé.

La situation géographique du Biodôme est une contrainte importante. En effet l'eau de mer utilisée pour le SLM est entièrement artificielle. Tout changement d'eau coûte cher au Biodôme. Actuellement une chaîne de traitements permet d'éviter que les changements d'eau soient trop fréquents. La chaîne comprend six filtres à sable pour

l'enlèvement de la matière organique, un lit percolant de nitrification pour l'enlèvement de l'azote ammoniacal, un dénitrificateur pour l'enlèvement des nitrates formés et une tour d'ozonation pour la désinfection et la destruction de la matière organique réfractaire. A l'heure actuelle il n'existe pas de traitement pour l'enlèvement du phosphore qui s'accumule jusqu'à des concentrations d'environ 20 mg P/L (Fig. 1-1).

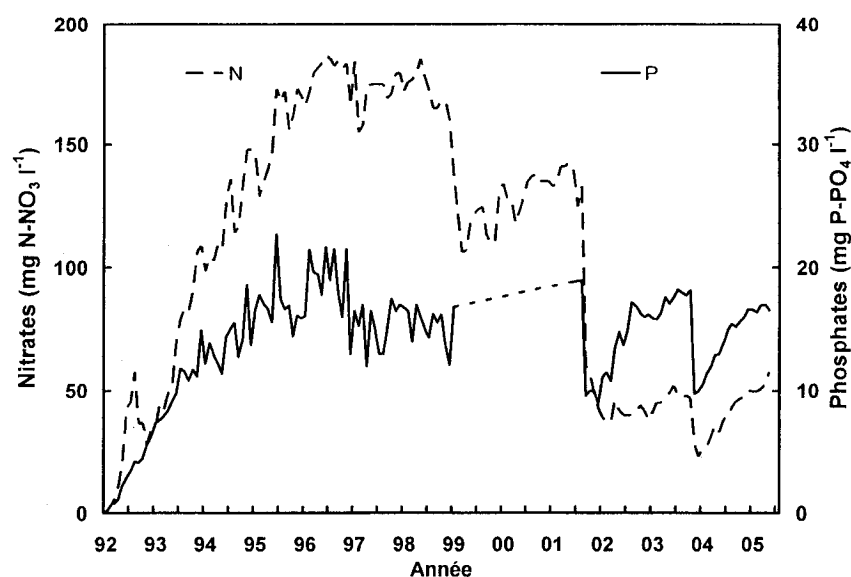


Fig. 1-1 : Évolution des concentrations de nitrate et de phosphate dans le SLM depuis l'ouverture du Biodôme en 1992. (source : Biodôme de Montréal, résultats non publiés)

Une étude a déjà abordé le sujet de l'enlèvement du phosphore par précipitation/adsorption sur scories d'aciérie (résultats non publiés) mais la mise en œuvre à pleine échelle s'est avérée compliquée et peu efficace. L'importante charge de phosphore entraînait le colmatage rapide du lit de scories, ce qui nécessitait le remplacement trop fréquent des scories. Aujourd'hui il est donc question de trouver un procédé permettant un enlèvement efficace, continu et simple d'opération en appliquant les résultats de la déphosphatation biologique en eau douce aux eaux salées du SLM. L'étude de ce procédé pourra également par la suite être adaptée aux effluents de pisciculture.

1.2 Objectifs de recherche

1.2.1 Historique des travaux de dépollution du SLM

Le dénitrificateur a été mis en place au Biodôme en 1998 afin de réduire la charge en nitrates dans l'eau du SLM et limiter ainsi les problèmes sanitaires des poissons qui y vivent. La filière de dénitrification est composée de deux réacteurs biologiques et d'un bassin de transfert. Une partie de l'eau en sortie de filtre à sable est prélevée pour être traitée. Le premier réacteur désoxygène l'eau à l'aide d'un lit bactérien fixe tandis que le deuxième dénitrifie l'eau avec un lit mobile. Les deux fonctionnent par addition de méthanol à l'entrée de chaque réacteur. Après le traitement, le bassin de transfert se charge de retourner l'eau en amont des filtres à sable.

Cette filière de traitement n'a pas donné les résultats escomptés et plusieurs études ont tenté d'en améliorer les performances. Tout d'abord Labbé, Parent & Villemur (2003) ont montré que l'addition d'éléments traces tels le cuivre, le fer et le manganèse permettait d'améliorer les taux de dénitrification jusqu'à 250%. Par la suite, Labelle et al. (2005) ont montré à l'aide d'un réacteur à biofilm en lit mobile à échelle pilote qu'il était possible de dénitrifier l'eau du SLM de 53 mg NO₃-N/L jusqu'à $1,7 \pm 0,7$ mg N-NO₃/L sans générer de sulfato-réduction. Enfin Dupla, Comeau, Parent, Villemur & Jolicoeur (2006) ont défini une configuration optimale pour permettre un mélange complet du réacteur et un type de support (Cascades-1A[®], Koch-Glitsch, Wichita, KS) qui favorise un auto-nettoyage performant des biosupports afin d'éviter l'accumulation de biomasse. Cette accumulation de biomasse sur les supports du réacteur à pleine échelle s'était avérée responsable de la création de zones mortes par aggrégation des biosupports entre elles et surtout de la sulfato-réduction.

1.2.2 Développement d'un procédé de déphosphatation biologique par bactéries déphosphatantes dénitrifiantes

A la suite des travaux encourageants en dénitrification et de l'échec de la mise en œuvre de la déphosphatation par adsorption/précipitation sur scories d'aciéries, il a été décidé de modifier le banc d'essai déjà en place afin de tester la mise en place d'une déphosphatation biologique pour traiter l'eau du SLM. Par la même occasion, cette étude pourrait servir au développement d'un procédé pour les piscicultures en CPF, les caractéristiques des eaux, hormis la salinité, étant relativement proche de celle du SLM.

La déphosphatation biologique est utilisée en eau douce depuis une vingtaine d'années. Elle permet l'enlèvement des phosphates des effluents municipaux en réduisant les volumes de boue produite par précipitation physico-chimique. Elle s'appuie sur une particularité métabolique de certaines bactéries qui stockent les phosphates de l'eau sous forme de polyphosphates (poly-P) (Comeau, Hall, Hancock, & Oldham, 1986; Mino, Van Loosdrecht, & Heijnen, 1998).

Dans la pratique, elle consiste à imposer à la biomasse une alternance de conditions anaérobie et aérobie ou anoxie (présence de nitrate mais pas d'oxygène). Pendant la période anaérobie, les organismes accumulateurs de phosphates (OAP) synthétisent des réserves de poly- β -hydroxyalcanoates (PHA) à partir des acides gras volatils (AGV) présents dans l'eau. Pour ce faire, les OAP consomment leurs réserves d'énergie intracellulaires, présentes sous forme de poly-P et de glycogène. L'hydrolyse des poly-P engendre un relargage de phosphates par la biomasse et augmente ainsi la concentration en phosphates dans l'eau. Pendant la période aérobie, les OAP utilisent les PHA pour leur croissance et la synthèse des poly-P. Celle-ci se fait grâce au captage par les bactéries des phosphates présents dans l'eau, ce qui a pour conséquence d'en abaisser la concentration. Lorsque les conditions anaérobies avec présence de substrat sont bien respectées, l'accumulation de phosphates en phase aérobie est supérieure au relargage

en phase anaérobie, ce qui entraîne un bilan négatif pour la concentration en phosphates dans l'eau.

La déphosphatation biologique peut également se faire en conditions anoxies, c'est-à-dire par respiration des nitrates. Le principe de fonctionnement des OAP dénitrifiants est le même que celui des OAP utilisant l'oxygène mais les rendements sont plus faibles (Kuba, Murnleitner, van Loosdrecht, & Heijnen, 1996). Ceci permettrait alors d'enlever simultanément les phosphates et les nitrates

Ce phénomène est bien observé en eau douce mais le SLM est un mésocosme marin froid (10°C). Les connaissances sur la déphosphatation biologique en eau de mer ne sont pas nombreuses mais les expériences qui ont été menées montrent une diminution de l'efficacité pour des PAO exposées à une salinité croissante (Intrasungkha, Keller, & Blackall, 1999; Panswad & Anan, 1999). Néanmoins ces expériences ont été menées sur une biomasse qui a été exposée à des concentrations croissantes en chlorure de sodium seulement. Dans le présent projet, il est question de développer une biomasse déphosphatante à partir des bactéries présentes dans le SLM, donc déjà adaptées au milieu marin. D'autre part, les effets de la température ralentissent la cinétique de réaction (Brdjanovic, van Loosdrecht, Hooijmans, Alaerts, & Heijnen, 1997), mais ne semblent pas avoir d'incidence sur la stoechiométrie des réactions biochimiques.

Le procédé développé s'appuiera sur les études préalablement menées et notamment il sera testé à l'aide du banc d'essai déjà en place au Biodôme. Compte tenu de la concentration élevée en nitrate dans l'eau du SLM, les conditions anaérobies nécessaires à la croissance des OAP s'avéreront difficiles à atteindre rapidement. Aussi pour ne pas dépendre de cette concentration, un bac de stockage sera ajouté au réacteur déjà existant et contiendra une eau anaérobie avec substrat. Par l'intermédiaire de pompe et de vanne, la biomasse attachée aux supports présents dans le réacteur sera exposée alternativement à l'eau anaérobie du bac de stockage puis à l'affluent à traiter

contenant les nitrates et les phosphates. C'est dans l'eau anaérobie du bac de stockage que s'effectuera le relargage de phosphates, donc leur concentration augmentera. C'est pourquoi le bac de stockage sera appelé « bac de concentrat » dans ce document.

1.2.3 Hypothèse et objectifs de recherche

L'hypothèse principale de recherche est que le procédé développé au Biodôme par réacteur séquentiel à lit mobile avec bac de concentrat doit permettre un enlèvement efficace des phosphates contenus dans l'eau grâce à un biofilm de bactéries déphosphatantes dénitrifiantes.

Un premier objectif sera de faire croître un biofilm déphosphatant dénitrifiant sans inoculum en eau de mer sur des supports plastiques de type Cascades 1A[®]. Pour ce faire il est prévu de faire croître un biofilm dénitrifiant puis de l'enrichir en OAP à l'aide du procédé avec bac de concentrat. Un deuxième objectif sera de déterminer les conditions optimales pour obtenir le meilleur rendement possible en termes de substrat à ajouter et de temps d'exposition aux différentes conditions.

1.3 Organisation du mémoire

Ce mémoire est composé de sept chapitres. Au chapitre 2 est présentée une revue de littérature recensant les différentes connaissances théoriques sur la déphosphatation biologique dénitrifiante (BioPN) ainsi que tous les éléments nécessaires à la compréhension des sujets et argumentations subséquentes. Le chapitre 3 présente la méthodologie employée, le mode de fonctionnement des réacteurs et explique le fonctionnement du modèle informatique qui a été utilisé pour tester le procédé. Les résultats de cette modélisation ainsi que les résultats obtenus en eau de mer puis en eau douce ont fait l'objet d'un article soumis à *Water Research* présenté intégralement dans le chapitre 4. Les résultats non consignés dans l'article du chapitre 4 sont présentés au

chapitre 5. Ce chapitre aborde notamment des essais de respirométrie réalisés sur le concentrat, les résultats complémentaires de la modélisation et un chapitre sur les performances de la biomasse développée en eau douce. Le chapitre 6 présente une discussion sur l'ensemble des résultats présentés dans les chapitres 4 et 5. Une comparaison des résultats en eau douce et de la modélisation ainsi qu'une discussion menant au rejet de l'hypothèse de travail y sont présentés. Le chapitre 7 conclut, sur la base de l'ensemble des résultats présentés, de l'impact de ce projet et des perspectives qu'il ouvre sur la compréhension des phénomènes de la déphosphatation biologique.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTERATURE

2.1 Conditions du SLM

L'eau du SLM est une eau de mer synthétique, reconstituée à l'aide du mélange de sels Instant Ocean (Aquarium Systems Inc., Mentor, OH). La chaîne de traitement actuelle est composée de six filtres à sable pour éliminer la matière organique, d'un ozoneur pour la désinfection de l'eau du bassin, d'un lit percolant pour nitrifier l'azote ammoniacal et d'un échangeur thermique pour maintenir la température de l'eau à 10°C.

Cette chaîne de traitement a plusieurs répercussions sur le traitement biologique envisagé. Tout d'abord, la faible teneur de l'affluent en matière organique (environ 4 mg/L au total) nécessite l'addition d'une source de carbone extérieure pour parvenir à éliminer la pollution en phosphates et en nitrates. Cette source externe entraîne un coût non négligeable au procédé mais elle permet également de choisir le substrat le plus efficace pour optimiser la déphosphatation biologique.

D'autre part, l'absence d'azote ammoniacal pourrait apporter une carence en azote pour la biomasse. Néanmoins Labelle et al. (2005) ont montré la possibilité de réaliser la dénitrification en eau de mer avec les nitrates comme seule source d'azote. Il est donc probable que la biomasse visée utilise les nitrates pour combler ses besoins métaboliques en azote.

Le Tableau 2-1 présente les différentes caractéristiques de l'eau du SLM utilisée le cadre de ce projet. Plusieurs données sont importantes et leur influence sur la

déphosphatation biologique sera abordée dans les paragraphes suivants. On peut d'ores et déjà souligner la valeur du pH de 7,5 et les concentrations très importantes en ions calcium, magnésium et potassium.

Tableau 2-1 : Caractéristique de l'eau du SLM lors des expériences (* : valeurs adaptées des données par Aquarium System Inc. pour une salinité de 28ppm).

	Units	SLM
Salinité	g/L	28 ± 3
O ₂ (mg/L)	mg/L	9.4 ± 0.4
Temperature (°C)	°C	9.6 ± 0.3
pH		7.5 ± 0.1
NO ₃ ⁻	mgN/L	69.3 ± 6.7
PO ₄ ³⁻	mgP/L	21.8 ± 2.21
Ca ²⁺	mg/L	320 *
Mg ²⁺	mg/L	1056 *
K ⁺	mg/L	336 *

2.2 Déphosphatation biologique et dénitrification

2.2.1 Un groupe de bactéries concurrentes

Les principes de la déphosphatation biologique ont été présentés dans l'introduction de ce mémoire. Un bref rappel va être effectué dans cette section pour ensuite approfondir les conditions expérimentales favorisant la croissance des OAP. Ceux-ci sont des bactéries qui sont capables de faire des réserves de substrat en présence d'AGV, tels que l'acétate et le propionate, et sous conditions anaérobies grâce à des réserves énergétiques intracellulaires stockées sous forme de poly-P et de glycogène. C'est leur capacité à synthétiser des poly-P qui va rendre la déphosphatation biologique efficace.

Un autre groupe de bactéries est capable d'effectuer l'assimilation d'AGV sous conditions anaérobiques. Ce sont les organismes accumulateurs de glycogène (OAG) (Cech & Hartman, 1993). Ces bactéries n'utilisent pas les poly-P mais uniquement le glycogène comme source d'énergie (Mino et al., 1998). Elles n'ont donc aucune efficacité d'enlèvement des phosphates. Pour obtenir un enlèvement efficace des phosphates, il convient donc de minimiser la croissance de ces organismes et de maximiser celle des OAP.

2.2.2 Le choix de la source de carbone

La source de carbone influe directement sur la formation de PHA. Selon Randall & Liu (2002), l'acétate est l'AGV qui permet d'assimiler le plus de phosphate en phase aérobie. D'autre part, selon Oehmen, Yuan, Blackall & Keller (2005), l'alternance entre l'acétate et le propionate favorise la croissance des OAP au détriment des OAG car ils s'adaptent plus rapidement au substrat présent. Enfin plusieurs études montrent que le ratio DCO/P de l'effluent à traiter doit être maintenu faible (10-20 mg DCO/mg P) (Oehmen et al., 2007) afin de favoriser les OAP sur les OAG. Dans le présent projet, l'acétate sera utilisé comme source de carbone. Si les analyses révèlent la présence d'OAG, l'alternance avec le propionate pourra être envisagée ou le ratio DCO/P pourra être abaissé.

2.2.3 Conditions favorisant les organismes déphosphatants dénitrifiants

Bortone et al. (1996), Ahn, Daidou, Tsuneda & Hirata (2001) et Spagni, Stante & Bortone (2001) ont montré l'existence de deux populations différentes pour les OAP et les organismes dénitrifiants accumulateurs de polyphosphates (ODAP). Ces études confirment qu'il est possible de faire croître les ODAP en absence d'une phase aérobie. Théoriquement, l'efficacité thermodynamique favorise les OAP aérobies, qui par cet avantage peuvent lessiver les ODAP (Filipe & Daigger, 1999). Néanmoins plusieurs

études démontrent que l'introduction d'une phase aérobie est bénéfique pour les ODAP. Spagni et al. (2001) ont aussi étudié la possibilité d'opérer un procédé EBPR en alternant uniquement les phases anaérobie et anoxie. Ces auteurs soulignent que la présence d'une phase aérobie suite à la phase anoxie favorise la stabilité du procédé. Cette remarque concorde également avec les observations de Bortone et al (1996) qui ont réussi à développer les deux populations de OAP et ODAP en utilisant une très courte période aérobie. L'eau du SLM contient de l'oxygène à saturation, qui devra d'abord être consommé par la biomasse afin d'atteindre l'anoxie. Ce paramètre ne devrait donc pas poser de problème quant aux performances et à l'établissement des deux populations désirées. Il devrait même lui être favorable.

Enfin, pour favoriser la croissance des OAP, la présence simultanée d'un donneur et d'un accepteur d'électron est à éviter en tout temps (Mino et al., 1998). Les procédés séquentiels (RBS) à biofilm se prêtent bien à cette contrainte car ils permettent la vidange complète du liquide entre les différentes phases d'un cycle (Kern-Jespersen, Henze, & Strube, 1994).

2.3 Impact des conditions environnementales sur la déphosphatation biologique par ODAP

2.3.1 Effet de la température

Erdal, Erdal & Randall (2003b) ont montré que les OAP étaient capables d'adaptation homéovisqueuse (augmentation de la proportion d'acides gras dans la membrane pour en maintenir la fluidité) à des températures aussi faibles que 5°C. Ils ont attribué donc les pertes de performances observées à faibles températures par certains auteurs à de mauvaises conditions d'opération plutôt qu'à une incapacité de la biomasse à s'adapter au froid.

D'un strict point de vue stoechiométrique, la température ne semble pas avoir d'influence sur le relargage de phosphates en condition anaérobie. En revanche on peut noter une différence notable en ce qui concerne l'absorption de phosphate puisque le ratio $P_{\text{assimilé}}/O_{2\text{consommé}}$ passe de 1,02 à 1,16 si la température augmente rapidement de 5°C à 20°C (Brdjanovic et al., 1997). Cette différence s'atténue si les changements de température sont faits plus lentement (Brdjanovic et al., 1998).

Du point de vue cinétique, l'ensemble des réactions métaboliques est affecté par la température (Bactens, Vanrolleghem, Van Loosdrecht, & Hosten, 1999). Elles sont croissantes de 5 à 20°C, sauf pour l'assimilation de phosphore aérobie, qui plafonne entre 15 et 20°C. Suite à une baisse de température de 10 à 5°C, Helmer & Kunst (1998), n'ont pas observé de baisse d'efficacité de déphosphatation.

Erdal, Erdal & Randall (2003a), suggèrent que, même si les cinétiques sont moins élevées à faible température, les performances des procédés EBPR sont accrues dues à un avantage compétitif des PAO sur les GAO, le premier groupe étant psychrophile. Ces mêmes auteurs ont aussi observé que la réserve en glycogène était plus faible à basse température et que les voies métaboliques pourraient donc être différentes de celles proposées à ce jour. La température du SLM devrait donc être favorable à la croissance d'un biofilm d'OAP mais les cinétiques devraient être faibles.

2.3.2 Effet du pH

Le pH influence la stoechiométrie des mécanismes impliqués en EBPR. Filipe, Daigger & Grady Jr. (2001) ont notamment observé que le ratio $P_{\text{relargué}}/Ac_{\text{assimilé}}$ augmente avec le pH. Ce phénomène serait le résultat d'une plus grande demande énergétique pour l'assimilation d'acétate à pH élevé ou un mécanisme de régulation du pH intracellulaire.

D'autre part il semble que les OAP tirent un avantage compétitif sur les OAG à pH élevé. Au dessus d'un pH de 7,5, les OAP assimilent l'acétate plus rapidement que les OAG (Oehmen, Vives, Lu, Yuan, & Keller, 2005). En revanche, l'inverse se produit à des pH inférieurs à 7,25 (Filipe et al., 2001). Le pH du SLM devrait donc être favorable au développement d'un biofilm d'OAP.

2.3.3 Effet des nitrites

Il existe une certaine disparité dans les résultats présentés dans la littérature en ce qui concerne l'utilisation des nitrites comme accepteurs d'électrons. Kuba et al. (1996) ont observé que des concentrations d'environ 5 à 10 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ inhibaient l'assimilation de phosphates par les OAP. Meinhold, Arnold & Isaacs (1999) ont observé que de faibles concentrations de nitrites ne nuisent pas à l'assimilation de phosphate en anoxie. Cependant, pour des concentrations supérieures à 8 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, l'assimilation de phosphate est complètement inhibée en anoxie et partiellement en aérobie. Cet effet persiste plusieurs heures après une exposition ponctuelle à de telles concentrations. Cette étude suggère que les nitrites interfèrent avec l'utilisation des PHA. Cependant il convient de noter que les boues activées utilisées dans ces études n'étaient pas acclimatées aux nitrites.

Ahn, Daidou, Tsuneda & Hirata (2001) ont montré que les nitrates comme les nitrites pouvaient être utilisés comme accepteur d'électrons. Dae Sung, Che Ok & Jong Moon (2001) ont observé qu'à une concentration de 10 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ et avec une biomasse acclimatée à la présence de 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, le taux d'assimilation des phosphates était plus élevé avec les nitrites qu'avec les nitrates. Pour le présent projet, la concentration en nitrites pouvant dépasser les 20 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ lors de la dénitrification (Labelle et al., 2005), il sera important de suivre l'activité du biofilm sous de telles conditions.

2.4 Réacteur à lit mobile

Pastorelli, Canziani, Pedrazzi & Rozzi (1999), Helness & Odegaard (1999) ainsi que Brandt, Sieker & Hegemann (2002), ont étudié des procédés EBPR à lits mobiles opérés en réacteurs biologiques séquentiels (RBS). Pastorelli et al. (1999) et Helness et Odegaard (1999) ont obtenu de bonnes performances d'enlèvement de phosphates à condition d'optimiser les durées des différentes phases. Brandt et al. (2002) ont pu obtenir un maximum de 80% d'enlèvement (affluent entre 10 et 15 gP/L) mais ces résultats n'ont pu être maintenus et par moments il n'y avait tout simplement plus d'enlèvement et ce, sans raison apparente.

Martin Martin, Lopez Enriquez, Fernandez-Polanco, Villaverde & Garcia-Encina (2007) ont obtenu deux résultats complètement différents en traitant un effluent industriel, contenant entre 12 et 15 mg P/L, avec deux MBBR hybrides (supports dans une boue activée) remplis l'un avec de la sépiolite, l'autre avec du charbon activé en grain. L'enlèvement du phosphore a atteint 80% dans le réacteur avec sépiolite et 0% dans le réacteur avec charbon activé en grain. La responsabilité a été portée sur le type de support qui aurait adsorbé des substances toxiques et inhibé la croissance de la biomasse.

L'utilisation d'un MBBR semble donc convenir à la déphosphatation biologique. Dans la mesure où les supports utilisés seront inertes vis-à-vis de la biomasse, on peut envisager un rendement de l'ordre de 80%.

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

Ce projet s'est déroulé en deux étapes : une première étape de modélisation afin de vérifier que les objectifs visés étaient atteignables puis une étape expérimentale permettant de tester le procédé. Cette deuxième étape était composée de deux expérimentations, une première en eau de mer avec l'eau du SLM et une seconde en eau douce avec un effluent synthétique reconstitué. La présente section présentera le procédé et son fonctionnement lors des deux expérimentations, la modélisation, le protocole du test de respirométrie qui a été réalisé entre les deux expérimentations ainsi que l'ensemble des techniques analytiques utilisées au cours de ce projet.

3.1 Procédé de traitement

3.1.1 Principe de fonctionnement du procédé

L'objectif de ce procédé était de pouvoir réaliser l'alternance des phases aérobie (ou anoxie) et anaérobie nécessaire au développement des bactéries déphosphatantes, sans dépendre de la concentration élevée en nitrate du SLM et de certaines piscicultures en circuit fermé. Comme le procédé est destiné aux piscicultures, il a été décidé d'utiliser une biomasse fixée afin de faciliter la gestion de l'installation, notamment au niveau du soutirage des boues.

Un bac rempli d'une eau anaérobie a alors été ajouté à chaque réacteur du banc d'essai précédemment utilisé pour la dénitrification afin de disposer d'une phase anaérobie en tout temps. Dans la suite de ce document ce bac sera appelé « bac de concentrat » car c'est dans cette phase anaérobie que les bactéries relarguent les phosphates et donc les

concentrent dans l'eau du bac. L'alternance des phases était donc créée par un échange d'eau entre celle du concentrat (anaérobie) et l'eau à traiter (aérobie ou anoxie).

3.1.2 Description du banc d'essai

Le banc d'essai utilisé était le même que celui utilisé par Labelle et al (2005). Les réacteurs avaient donc les mêmes caractéristiques hydrauliques (réacteurs complètement mélangés de 110 L) que ceux précédemment cités. La Fig. 3-1 présente le schéma d'aménagement d'un réacteur à lit mobile. La recirculation met en mouvement des supports en plastique (Cascades-1A[®], Koch-Glitsch, Wichita, KS) sur lesquels se développe le biofilm. Ces supports ont une densité plus faible que l'eau et sont retenus à la surface par une grille conique de 45°. Un éducteur, positionné sur la conduite de recirculation au dessus de la grille, projette les supports au fond du réacteur et permet ainsi un mélange complet de ce dernier.

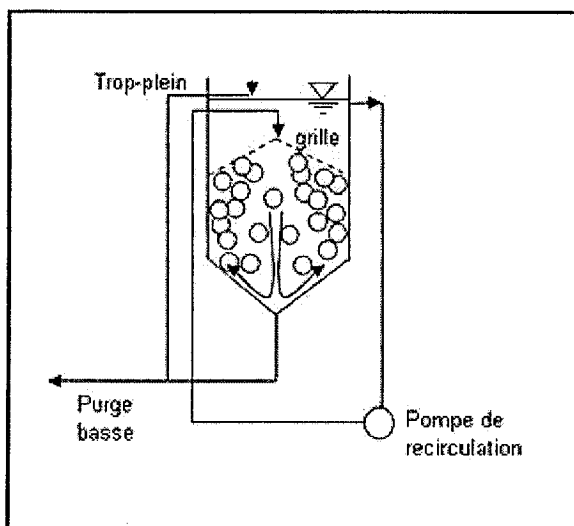


Fig. 3-1: Schéma d'un réacteur à lit mobile

Le banc d'essai était composé de deux réacteurs identiques R1 et R2. La conduite d'alimentation était unique pour les deux réacteurs. Elle était maintenue sous pression, soit par le système de circulation de l'eau du SLM pour les essais en eau de mer, soit

par gravité pour les essais en eau douce. Le remplissage en eau à traiter du réacteur était alors commandé par une vanne solénoïde (modèle W20 Coil, Plast-O-Matic Valves Inc., Cedar Grove, NJ, USA) en plastique résistante à la corrosion (Fig. 3-2 et Fig. 3-3). La recirculation était assurée par une pompe centrifuge (modèle TE-5-MD-SC, Little Giant Pump Co., Oklahoma City, OK, USA). L'originalité du système vient de l'implantation du bac de concentrat de 220 L (IB 1801, Bonar Plastics, Lindsay, ON, Canada) permettant l'alternance des phases aérobie et anaérobie. Le transfert de l'eau anaérobie du concentrat vers le réacteur était assuré par une pompe centrifuge (AC-4C-MD, March MFG Inc., Glenview, Ill.) alors que le retour dans le bac se faisait par gravité. Pour permettre les différents transferts et vidanges, les réacteurs étaient équipés de deux vannes 3 voies (QAT-CENTREOFF, Chemline Plastic Limited, Thornhill, On.). Leur utilisation est décrite dans le paragraphe 3.1.3 et 3.1.4 lors de la description des différents cycles.

Chaque réacteur était relié à un panneau de contrôle individuel. Sur la conduite de recirculation étaient installés une sonde de pH, une sonde ORP (DynaProbII pH et ORP, Broadley-James Corp., Irvine, CA, USA), une sonde à oxygène (Oxymax W COS61, Endress + Hauser, Burlington, ON, Canada) et un analyseur de nitrate en ligne par absorption du spectre UV à 220 nm (NX 1000, AWA Instrument, Duluth, GA, USA). Le contrôle de l'ensemble du banc d'essai et l'acquisition des données ont été réalisés à l'aide du logiciel *LabView 7.1*. L'acquisition des données et le contrôle des pompes et des vannes 3 voies étaient possibles grâce à un module d'acquisition OMEGA OMB-DAQ-56 et d'une extension OMEGA OMB-PDQ1.

3.1.3 Méthodologie en eau de mer

La Fig. 3-2 présente le schéma du banc d'essai dans la configuration utilisée pour l'eau de mer.

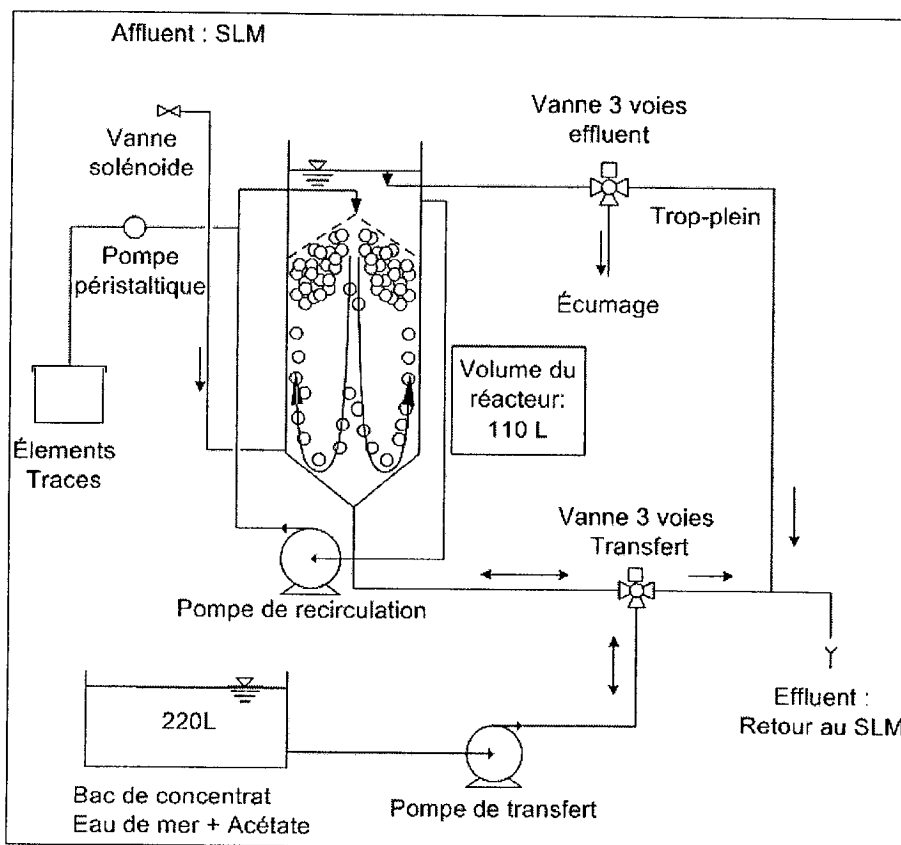


Fig. 3-2: Schéma du banc d'essai en eau de mer

Lors de cette expérience, l'acétate était injecté directement dans le bac de concentrat alors que la solution d'éléments traces était injectée par une pompe péristaltique à deux canaux (modèle C/L 77120-52, Cole-Parmer Masterflex, Vernon Hills, IL) dans le réacteur durant la phase de croissance.

Chaque réacteur contenait 35 L de supports pour atteindre un pourcentage d'occupation volumétrique d'environ 30 % (35 L / 110 L). L'expérimentation en eau de mer s'est déroulée en deux périodes, une période de croissance d'un biofilm dénitrifiant et une période d'enrichissement pour obtenir un biofilm déphosphatant. L'hypothèse était alors qu'une fraction de la biomasse dénitrifiante serait aussi déphosphatante et que l'alternance de conditions anaérobies et anoxies permettrait l'enrichissement de cette fraction déphosphatante. Chaque période consistait en une succession de cycles. Chaque cycle était composé de plusieurs phases, différentes pour chaque période. Le Tableau

3-1 résume le minutage des phases d'un cycle et les deux sections suivantes présentent le déroulement des phases.

Tableau 3-1 : Minutage des phases d'un cycle pour les deux périodes l'expérimentation en eau de mer

Période	Phases d'un cycle						Durée totale d'un cycle
	Transfert par pompe	Anaérobie	Transfert gravitaire	Changement d'eau	Aérobie / Anoxie	Vidange	
Croissance	-	-	-	15 min	345 min	-	360
Enrichissement	5 min	60 to 90 min	15 min	10 min	120 min to 210 min	15 min	225 min to 345 min

3.1.3.1 Période de croissance du biofilm

Cette première période a duré 20 jours. Lors de celle-ci, un biofilm dénitrifiant a été développé sur les médias par injection d'acétate lors de la phase de croissance jusqu'à consommation complète des nitrates. Cette période a duré 20 jours pour R1 et 19 jours pour le R2. La séquence des phases était la suivante :

Phase changement d'eau : changement de l'eau du réacteur avec l'eau du SLM par débordement en trop-plein.

Phase de croissance : dès la fin de la phase « changement d'eau », une solution d'acétate à 20% (masse d'acétate (mg DCO) /volume de solution) ainsi qu'une solution d'éléments traces ont été injectées afin de ne pas être en conditions limitantes de substrat. La durée d'injection du substrat a varié entre 5 min et 10 min, suivant le développement du biofilm, pour un débit de 18,1 mL/min pour R1 et 17,6 mL/min pour R2. Les éléments traces ont été injectés pendant la même durée que l'injection d'acétate mais à des débits plus faibles (0,7 mL/min pour R1 et 1,1 mL/min pour R2). Une fois l'injection terminée, la phase de croissance continuait pendant encore 5h30. Cette phase durait 5h45 pour une durée totale du cycle de 6h. Le suivi a été réalisé sur la concentration en oxygène dissous et la concentration en nitrate. Une fois que le biofilm

a été suffisamment important pour consommer tout l'oxygène et tous les nitrates durant la phase de croissance, l'étape d'enrichissement a été lancée.

3.1.3.2 Période d'enrichissement

Cette deuxième période a duré 154 d. Lors de celle-ci, une eau de mer était préparée dans le concentrat à partir de sels de mer Instant Ocean® (Aquarium Systems Inc., Mentor, OH) pour garder une salinité proche de celle du SLM entre 28 et 30 g/L. La durée de vie d'un concentrat était d'environ une semaine et la température était maintenue entre 11 et 13°C par un système de circulation de l'eau du SLM dans le bac. Ces mesures permettaient de limiter la sulfato-réduction. L'acétate a également été injecté dans ce bac par ajout manuel de volumes de solution à 20 %.

Durant la période d'enrichissement, la séquence des phases était la suivante :

Phase de remplissage : l'eau du SLM était envoyée dans le réacteur durant 10 minutes, l'excédent étant évacué par débordement.

Phase de croissance : c'était lors de cette phase que les nitrates et l'oxygène étaient consommés et que la biomasse pouvait assimiler les phosphates avec les réserves de PHA intracellulaire (si existantes et suffisantes). Sinon, le biofilm consommait l'oxygène et les nitrates par respiration endogène puisqu'il n'y avait pas d'apport de source de carbone externe. La durée de cette phase a varié entre 2h et 3h30 selon les conditions opératoires.

Phase de vidange : l'eau était envoyée par gravité au drain vers la récupération de l'eau du SLM et retournée en amont des filtres à sables de la boucle de traitement générale. Le temps de vidange était de 15 min pour s'assurer de minimiser la quantité d'oxygène et de nitrates pouvant se retrouver dans le concentrat.

Phase de transfert par pompe : le concentrat contenant l'acétate en excès était transféré dans le réacteur. Le temps de fonctionnement de la pompe était ajusté pour ne pas créer de débordement et ainsi ne pas perdre l'eau du concentrat.

Phase anaérobie : d'une durée variant entre 1h et 1h30 suivant les conditions expérimentales appliquées, c'était la phase de stockage de l'acétate par les bactéries sous forme de PHA grâce aux réserves de Poly-P, réalisées en phase de croissance.

Phase transfert gravitaire : Le réacteur se vidait gravitairement dans le bac de concentrat par le même circuit que pour le remplissage. Un certain volume résiduel (riche en acétate) pouvait rester dans le fond du réacteur et les conduites de recirculation. Ce volume a été mesuré à 1,25L.

3.1.4 Méthodologie en eau douce

Cette expérimentation a duré 240 jours. Le Tableau 3-2 présente le temps des phases d'un cycle pour l'expérimentation en eau douce

Tableau 3-2 : Minutage des phases d'un cycle pour l'expérimentation en eau douce

Phases d'un cycle						Durée totale d'un cycle
Transfert par pompe	Anaérobie	Transfert gravitaire	Changement d'eau	Aérobie / Anoxie	Vidange	
5 min	90 min	15 min	5 min	150 min to 180 min	15 min	280 min to 310 min

La Fig. 3-3 présente le schéma du banc d'essai en eau douce. Plusieurs différences notables sont à prendre en compte pour les expériences en eau douce. Tout d'abord l'eau d'alimentation était une eau synthétique préparée dans un réservoir de 5m³. Cet affluent synthétique était préparé avec de l'eau potable de la ville de Montréal additionnée de phosphate de sodium, de nitrate de sodium, de chlorure d'ammonium et de chlorure de potassium. Les concentrations visées étaient de 15 mg P-PO₄/L, 35 mg N-NO₃/L, 5 mg N-NH₄/L et 10 mg K/L. De la même façon qu'en eau de mer, une solution d'éléments traces était injectée. Pour des questions pratiques de mise en œuvre elle était également injectée dans le réservoir de 5m³. La température de l'eau visée était de 20°C mais l'absence de possibilité de contrôle de ce paramètre dans l'installation a entraîné des variations de température entre 17 et 23°C durant la durée de

l'expérimentation. Suite au développement dans le réservoir d'alimentation de bactéries nitrifiantes qui consommaient l'oxygène et généraient des nitrites, l'ajout d'azote ammoniacal a été supprimé après 90 jours d'expérimentation en eau douce. Pour sa part, la solution d'acétate a été tout d'abord ajoutée manuellement dans le concentrat, comme pour l'eau du SLM, durant toute la phase d'établissement du biofilm. Puis elle a été injectée directement dans le réacteur par une pompe péristaltique (modèle L/S 77200-62, Cole-Parmer Masterflex, Vernon Hills, IL).

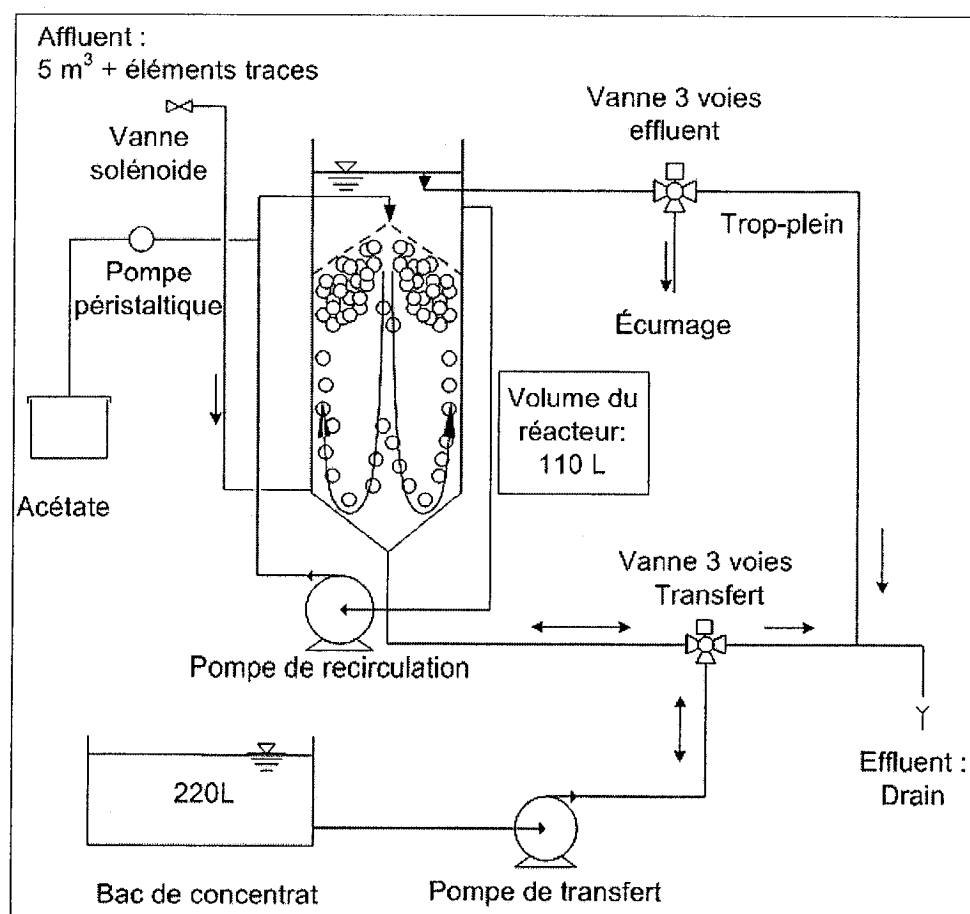


Fig. 3-3: Schéma du banc d'essai en eau douce

Pour faire croître le biofilm, en absence de bactéries indigènes dans l'eau d'alimentation, il a été décidé de réaliser unensemencement à l'aide de boues activées provenant de la station d'épuration de Granby (QC). Cette station a connu des épisodes de déphosphatation biologique par le passé, ce qui permettait d'envisager la présence de

bactéries déphosphatantes dans la biomasse présente. Cependant, un test de relargage de phosphates réalisé sur ces boues sous conditions anaérobies en présence d'acétate n'a pas révélé la présence d'une telle biomasse.

L'ensemencement du réacteur a donc été réalisé en commençant directement selon le mode enrichissement de l'eau de mer mais en injectant deux fois par jour en phase de croissance 500 mL de boues activées. Cette période d'ensemencement a duré 10 d. Par la suite le mode enrichissement a fonctionné durant 240 jours pour le R1 et 219 jours pour le R2.

3.1.5 Calibration du banc d'essai

Lors des changements d'eau, les conduites de recirculation ne pouvaient pas se vider entièrement. Il restait donc 1,25 L d'eau de la phase précédente, ce qui entraînait des pollutions en phosphore dans le bac de concentrat. Afin de pouvoir exploiter les mesures réalisées dans le bac de concentrat sans impact de ces volumes morts, une courbe de calibration a été réalisée caractérisant l'accumulation de phosphates dans le concentrat sans présence de biomasse. L'essai complet est présenté en annexe A. Cet essai a donné les équations Éq 3-1 pour R1 et Éq 3-2 pour R2. Par la suite, suivant le nombre de cycles réalisés, la concentration en phosphates donnée par ces équations était déduite de la concentration mesurée dans le bac de concentrat. Ainsi les concentrations présentées dans ce mémoire représentent les concentrations nettes de phosphates relargués par la biomasse.

$$y = 0,1576 x + 0,0833 \quad (R^2 = 0,97) \quad (\text{Éq. 3-1})$$

$$y = 0,1285 x + 0,1798 \quad (R^2 = 0,98) \quad (\text{Éq. 3-2})$$

Où :

y : concentration en phosphates mesurée dans le bac de concentrat (mg P/L)

x : nombre de cycles effectués

3.2 Modélisation

La modélisation de l'ensemble Affluent / Bioréacteur / bac de concentrat a été modélisé à l'aide du logiciel WEST[®] (HEMMIS, Kortrijk, Be). Le procédé a été modélisé à l'aide des modèles ASM3 (Gujer, Henze, Mino, & Van Loosdrecht, 1999) et du module Bio-P de l'EAWAG (Rieger, Koch, Kuhni, Gujer, & Siegrist, 2001). L'objectif de la modélisation était double : montrer la faisabilité du procédé et tester le protocole d'enrichissement.

Le bioréacteur (BR) était modélisé par l'objet *PumpedVolumePhaseSeparationASU*, le bac de concentrat (ST) et le SLM étaient tous les deux modélisés par l'objet *PumpedVolumeASU* (Fig. 3-4). L'objet modélisant BR est un réacteur à boue activée à volume variable dont les vidanges sont réalisées par une pompe de débit Q_{BRout} contrôlable. Le volume d'eau vidangeable est compris entre des volumes maximum et minimum autorisés et préalablement défini (V_{max} et V_{min}). De plus l'absence de modèle de biofilm performant ne permettant pas une modélisation représentative du procédé réel, la phase liquide et la phase particulaire sont dissociées. Ceci permet de simuler le biofilm en conservant la biomasse à l'intérieur du réacteur et en la maintenant à une concentration constante pour simuler l'effet de l'arrachement du biofilm généré normalement par les conditions hydrauliques. La fraction de solides totaux (TSS) vidangée est définie par le paramètre F_X_OUT qui peut varier entre 0 et 1. Il n'y avait pas de nécessité de mettre une séparation de phase pour le SLM et le bac de concentrat. Les paramètres des trois réacteurs SLM, ST et BR sont définis dans le Tableau 3-3.

Tableau 3-3 : Définition des paramètres modélisés pour SLM, BR et ST

Objet	Paramètre	Valeur pour l'étude	unité
SLM	V	3250000	m ³
	Vmax	3250000	m ³
	Vmin	100000	m ³
	k _{La}	0	d ⁻¹
ST	V	220	m ³
	Vmax	220	m ³
	Vmin	5	m ³
	k _{La}	0	d ⁻¹
BR	V	113,965	m ³
	Vmax	113,965	m ³
	Vmin	0,1	m ³
	k _{La}	0	d ⁻¹

Le contrôle des phases était effectué par le contrôleur C1 (Fig. 3-5). Une variable *ID* permet de définir la phase dans laquelle se trouve le modèle. Cette variable peut prendre 8 valeurs (0 à 7). Chaque valeur correspond à une phase et chaque phase est définie par des états de vanne, des temps de fonctionnement et des débits de pompe ou des concentrations. *Prev_time* est une variable qui permet de déterminer le temps écoulé dans la phase, elle prend la valeur de *t* à début de phase. *Tvar* définit, elle, la durée de la phase en cours.

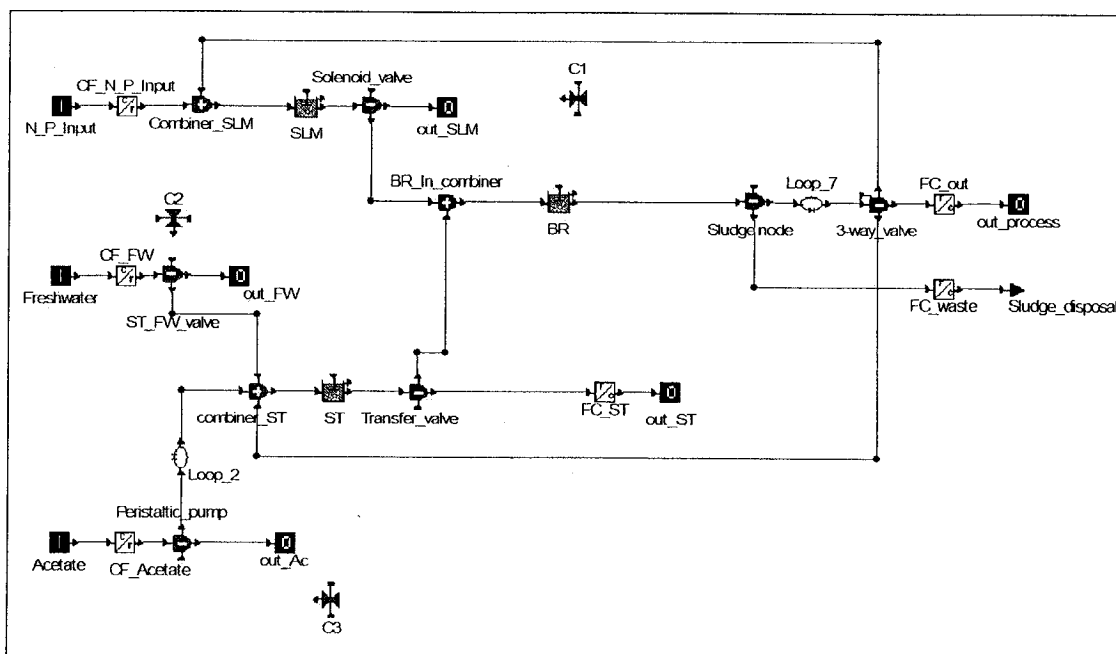


Fig. 3-4 : Schéma d'implantation des différents objets de la modélisation dans WEST®.

BR est un réacteur à volume variable avec séparation de phase afin de garder la biomasse à l'intérieur du réacteur. SLM et ST sont des réacteurs à volume variable. Le contrôleur C1 opère les changements de phases dans BR en le remplissant alternativement avec l'eau de SLM puis avec l'eau anaérobie de ST. Pour cela il contrôle Solenoid_valve, 3-way_valve et Transfer_valve et les pompes de BR et SLM. Chaque eau est retournée à son réacteur de départ afin d'éviter les mélanges. Il contrôle également Sludge_node afin de permettre la vidange des boues en fin de phase de croissance et maintenir une concentration constante de biomasse dans BR.

Le contrôleur C2 maintient le volume de ST à V_{max} quand l'eau de ST n'est pas dans BR en contrôlant l'ouverture de ST_FW_valve.

Le contrôleur C3 maintient la concentration en acétate de ST à une valeur de consigne quand l'eau de ST n'est pas dans BR en contrôlant le démarrage Peristaltic_pump.

Les contrôleurs C2 et C3 (Fig. 3-4) sont des contrôleurs proportionnels. Le contrôleur C2 est responsable de la régulation du niveau d'eau dans le concentrat lié à des pertes d'eaux numériques. En effet le remplissage séquentiel du réacteur entraîne des débordements minimes mais qui peuvent, cycle après cycle, vider la totalité du concentrat et arrêter la bloquer la simulation en phase Remplissage ST → BR par manque d'eau dans BR. Le contrôle est alors réalisé de la façon suivante : Si $ID \leq 4$, C2 attribut à Qout2 de ST_FW_valve un débit $u_{QSTfresh}$ tant que le volume de ST n'est pas à la valeur désirée. Le contrôleur C3 est responsable d'ajuster la concentration en acétate dans ST. Si $ID \leq 4$, C3 attribut à Qout2 de peristaltic_pump un débit u_{QAc} tant

que la concentration en substrat soluble dans ST n'est pas à la valeur désirée. Les paramètres utilisés lors de la modélisation pour les trois contrôleurs sont présentés dans le Tableau 3-4.

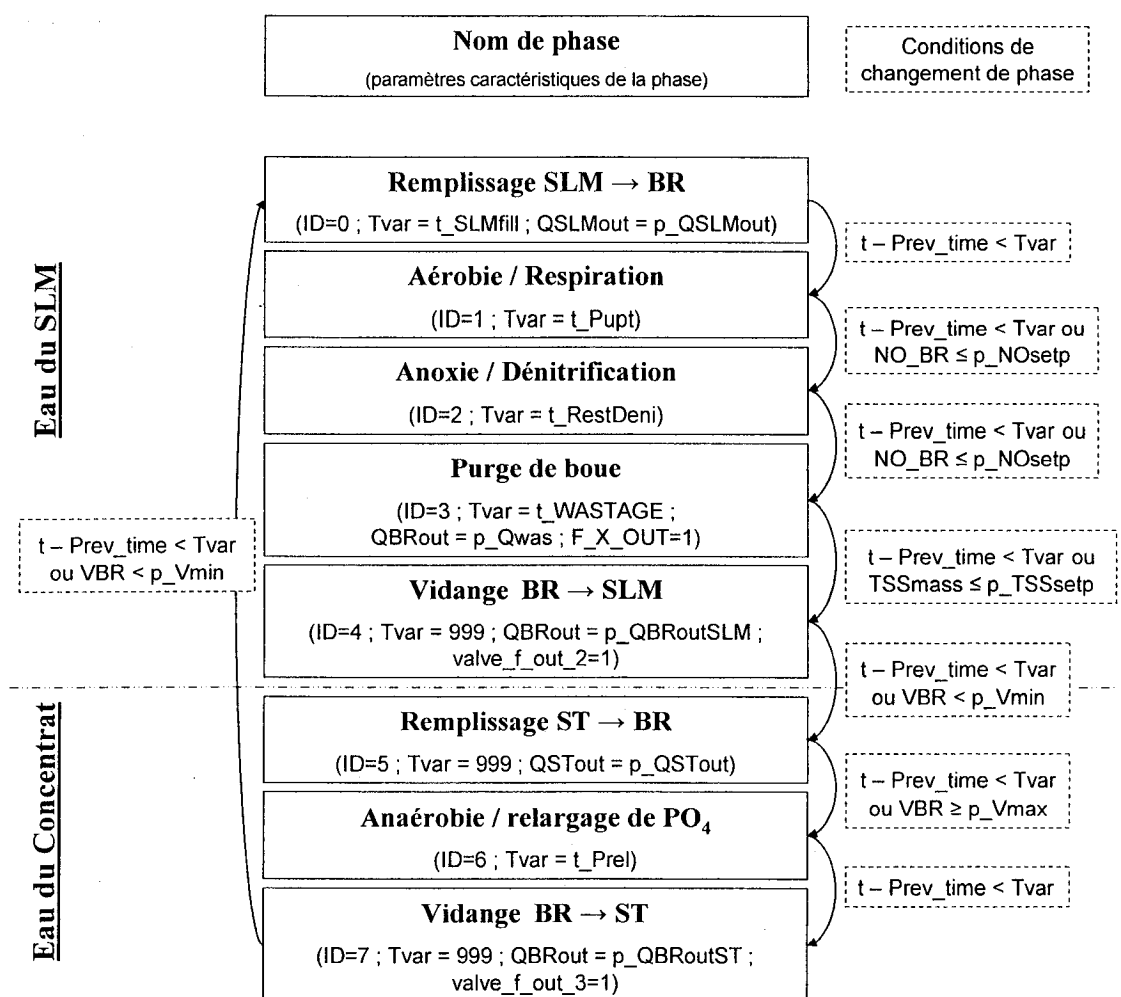


Fig. 3-5 : Diagramme de fonctionnement du contrôleur C1.

Le programme est présenté au complet dans l'annexe B.

Tableau 3-4 : Définition des paramètres modélisés pour les contrôleurs C1, C2 et C3

Objet	Paramètre	Valeur pour l'étude	unité
C1	p_Nosetp	0,5	g/m ³
	p_QBRoutSLM	12000	m ³ /d
	p_QBRoutST	14682,14	m ³ /d
	p_QSLMout	16223,76	m ³ /d
	p_QSTout	39093,4	m ³ /d
	p_QWAS	10000	m ³ /d
	p_TSSsetp	205137	g
	p_Vmax	113,965	m ³
	p_Vmin	1,3	m ³
	t_Prel	60	min
	t_Pupt	120	min
	t_RestDeni	1E-20	min
	t_SLMfill	110	min
	t_WASTAGE	110	min
C2	Kp	10	-
	u0	50	-
	y_S (VST)	220	-
C3	Kp	10	-
	u0	50	-
	y_S (C(S_S))	200	-

3.3 Respirométrie

L'essai de respirométrie a été réalisé en eau de mer et avait pour objectif de vérifier si le concentrat était inhibiteur de l'activité biologique par la présence de sous-produits métaboliques dans l'eau. Le concentrat ayant une durée de vie d'une semaine, soit une cinquantaine de cycles d'opération, il aurait pu accumuler des sous-produits métaboliques néfastes à l'activité de la biomasse. Comme la seule source d'azote présente dans le réacteur étant les nitrates du SLM, il était également possible que les bactéries présentes ne soient pas capables d'utiliser les nitrates comme source d'azote et

qu'ainsi le biofilm ne puisse pas croître. Pour réaliser le test, une solution de boue activée a été préparée en grattant le biofilm sur une cinquantaine de supports d'un réacteur à l'aide d'une brosse. Des aliquotes de 10mL de la suspension ainsi obtenue ont été introduits dans différentes bouteilles de respirométrie de 500mL. Trois conditions différentes ont été testées en duplicata :

- l'eau du SLM avec ajout de 2000 mg DCO/L,
- le concentrat filtré sans nitrates avec ajout de 1500 mg DCO/L,
- le concentrat filtré avec ajout de 70 mg N-NO₃/L et de 1500 mg DCO/L,

L'expérience a été réalisée durant 3 jours à une température constante de 15°C à l'aide d'un respiromètre Challenge Environment System Inc. (Sayetteville, AR, USA), modèle Challenge AER 200. Deux témoins ont été testés sans biomasse respectivement avec l'eau du concentrat non filtré et l'eau du SLM. Une agitation de 800 rpm a été appliquée dans chaque bouteille.

3.4 Suivi de cycle

Afin de déterminer les différents paramètres de la biomasse, des suivis de cycle ont été réalisés. Pour ce faire, un prélèvement était réalisé toutes les 15 min pendant la durée d'un cycle et les analyses de phosphate, nitrate, ammoniac et DCO étaient réalisés.

3.5 Déterminations analytiques

3.5.1 Mesure de la biomasse

La mesure de biomasse était réalisée sur trois supports échantillonnés dans les réacteurs. Les supports prélevés étaient remplacés par des supports neufs afin de garder le même nombre de supports dans le réacteur. Les supports neufs ajoutés étaient marqués par une

fente afin d'effectuer des prélèvements sans remise et de pouvoir évaluer la biomasse présente depuis le début de l'expérience.

La biomasse était détachée des supports par un canon à ultrason VCX 750 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) dans un volume de 400 mL à 100% de la puissance (750 W) jusqu'à détachement de l'ensemble des matières (biofilm + précipité). De cette solution, un volume d'environ 70 mL était prélevé puis séché au moins 12h à 105°C. L'échantillon était pesé ce qui donnait la mesure des matières totales (MT). Il était ensuite carbonisé 30 min à 550°C puis pesé ce qui donnait la mesure des matières inorganiques totales (MIT). Les matières volatiles totales (MVT) étaient obtenues par différence entre les MT et le MIT. Les MT étaient évalués plutôt que les matières en suspension (MES) car la sonication entraînait la transformation d'une partie des matières en suspension en matières filtrables. Une fois les mesures réalisées, la concentration en MT était ramenée au nombre total de supports présents dans le réacteur puis divisée par le volume du réacteur pour avoir une concentration de biomasse en mg/L.

3.5.2 Analyses chimiques

Les mesures de phosphates et nitrates étaient réalisées en routine à l'aide des méthodes de terrain Phosver 3 et NitraVer 5 de Hach (Loveland, CO, USA). La mesure de nitrites était réalisée selon la méthode 4500-NO₂⁻ B du *Standard Methods* (APHA, AWWA, & WEF, 1998). Lors des suivis de cycles, les échantillons étaient filtrés sur des filtres Millipore de 0,45 µm de type HA et les analyses étaient réalisées à l'École Polytechnique selon les méthodes 4500-P G et 4500-NO₃⁻ I du *Standard Methods* (APHA et al., 1998) sur un analyseur Lachat Quickchem 8500 à trois canaux d'analyse (Lachat Instruments, Hach company, Loveland, CO, USA). Pour l'analyse de l'azote Kjeldahl, la méthode utilisée était la méthode 4500-Norg D et la méthode 4500-NH₃ H pour l'azote ammoniacal (APHA et al., 1998). La digestion utilisée pour déterminer le

phosphore total était la même méthode que pour une digestion Kjeldahl où l'usage d'un catalyseur (HgO) aide à convertir tous les composés phosphorés en ortho phosphates. Ces derniers étaient ensuite mesurés par la méthode 4500-P G du *Standard Methods* (APHA et al., 1998). En eau de mer, les analyses de carbone ont été réalisées sur un analyseur de carbone organique total Dohrman DC-180 muni d'un détecteur infrarouge Fuji 3300 (Dohrman div. De Rosemount Analytical, Santa Clara, CA, USA) selon la méthode 5310 C du *Standard Methods* (APHA et al., 1998). En eau douce, les mesures étaient directement réalisées à l'aide de tubes DCO basse gamme (< 150 mg DCO / L) selon le protocole de Hach.

CHAPITRE 4

BIOLOGICAL PHOSPHORUS REMOVAL IN A SEQUENCING MOVING BED BIOFILM REACTOR IN SEAWATER AND FRESHWATER

Ce chapitre présente les principaux résultats qui ont été obtenus lors de ce projet. Il a fait l'objet d'un article soumis à la revue *Water Research* et est retranscrit tel que soumis. Une introduction définit le contexte scientifique qui entoure le projet et présente la problématique abordée. Un paragraphe *materials and methods* présente le protocole expérimental qui a été mis en place, puis le paragraphe *results* présentent les résultats les plus pertinents obtenus pour la modélisation et les deux essais en eau douce et en eau de mer. Enfin un paragraphe *discussion* établit les raisons possibles de l'échec en eau de mer, la performance du procédé en eau douce et les perspectives de recherche pour son amélioration. Enfin une conclusion synthétise les résultats obtenus dans ce chapitre.

4.1 Abstract

A new process was developed to achieve denitrifying biological phosphorus removal in wastewaters containing high levels of nitrate and phosphate with a low level of organic matter. This could particularly be useful in recirculating systems such as aquariums or fish farms to prevent accumulation of nitrate and phosphates and to avoid regular cost extensive and polluting water replacement. Phosphorus (P) was removed from the influent in a sequencing moving bed biofilm reactor, stored in the attached biomass and then cyclically removed from the biomass by filling the reactor with anaerobic water from a stock tank. In this way phosphates were accumulated in the stock tank allowing

easy recovery for use as fertilizer. The feasibility of the experimental design was demonstrated by using the activated sludge model No. 3 (ASM3) complemented by the EAWAG Bio-P module implemented in the WEST simulation software. A pilot scale experiment was conducted in two identical reactors in two runs: one to treat water from a marine mesocosm, the other to treat a synthetic freshwater influent. No biological phosphorus removal was achieved during the seawater run, possibly because of the high level of calcium in seawater. During the freshwater run, average P removal efficiency was 20%, of which 80% was attributed to biological removal and 20% to chemical precipitation. Maximum phosphate reduction of 4.7 mg P/L was observed in the influent containing 14.2 mg P/L. It should be possible to improve the efficiency of this process in the near future.

4.2 Introduction

Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) has been used for over 20 years in wastewater treatment to remove nutrients while minimizing sludge production. The process is based on the fact that phosphorus accumulating organisms (PAOs) can accumulate intracellular phosphorus as polyphosphate (poly-P). In EBPR processes the biomass is exposed to cyclic alternation of anaerobic and aerobic/anoxic conditions. Under anaerobic conditions, PAOs store rapidly biodegradable substrate in their cells as poly- β -hydroxyalkanoates (PHA) by using intracellular poly-P and glycogen as energy sources (Comeau et al., 1986). Under aerobic or anoxic conditions, PAOs use PHA as a carbon source to refill poly-P and glycogen stocks (Kuba et al., 1996; Mino et al., 1998). Poly-P synthesis allows bulk phosphate to accumulate in the biomass. The phosphate is then removed with the biomass during aerobic/anoxic conditions. Another group of bacteria -- the glycogen accumulating organisms (GAOs) -- do also grow under cyclic alternation of anaerobic and aerobic/anoxic conditions. GAOs use exclusively glycogen as energy and therefore consume substrate but do not affect

phosphorus removal. To optimize EBPR processes, anaerobic conditions must be strictly controlled, poly-P storage maximized and GAOs growth minimized.

Poly-P storage is maximized by using acetate as a carbon source (Randall & Liu, 2002) because it favors the production of poly-P rather than other volatile fatty acids during aerobic periods. Environmental conditions known to favor PAOs over GAOs are temperature below 25°C (Erdal et al., 2003b) and pH above 7.5 (Filipe et al., 2001).

Aquariums and fish farms operated in closed circuit are faced with major accumulations of nitrates and phosphates that generate problems such as algae growth and toxicity for aquatic organisms (Camargo, Alonso, & Salamanca, 2005). Up to now, these systems had to regularly change or dilute the water causing highly polluted effluents. Denitrifying biological phosphorus removal (Bio-PN) therefore appears to be an interesting nutrient removal process that can be applied to these systems without producing excessive sludge (Rogalla, Johnson, & McQuarrie, 2006).

The Montreal Biodome operates a large, closed circuit, cold (10°C) marine mesocosm named St. Lawrence Mesocosm (SLM). Nitrate and phosphate values in the SLM can reach up to 180 mg NO₃-N / L and 28 mg PO₄-P/L. A previous study (Labbé, Parent, & Villemur, 2004) showed it was possible to denitrify the SLM water. A moving bed biofilm reactor (MBBR) was designed and denitrification was optimized with methanol as the carbon source (Dupla et al., 2006; Labelle et al., 2005). In the present study, this MBBR was modified in order to carry out Bio-PN. The pH (7.5), the temperature (10°C) and organic matter concentration (2-4 mg/L) of the SLM water are three parameters that favor biological phosphorus removal (BPR). The low concentration of organic matter in the SLM water necessitated the addition of an external carbon source during the anaerobic phase of the process so as to favor the growth of PAOs. This also limited the growth of ordinary heterotrophic organisms (OHOs) as in the newly

developed process they are never simultaneously exposed to oxygen and a carbon source.

Intrasungkha et al (1999) and Panswad & Anan (1999) showed that BPR performance decreases as salinity increases. However their experiments were done using sludge from an EBPR wastewater treatment plant exposed to increased salinity conditions by adding NaCl. At the Montreal Biodome, a biofilm was developed with bacteria from the SLM and was therefore already adapted to seawater conditions.

In the present paper, an original attached biomass process that allows BPR from waters containing a high concentration of nitrate is proposed. The process developed was based on the alternation of anaerobic and aerobic/anoxic conditions in a bioreactor where plastic carriers supported biofilm growth including a sequential complete exchange of two waters: the influent with nitrates and phosphates and the anaerobic water which was kept in a stock tank. In this way, the environmental conditions only allowed PAOs to grow. A second advantage is that phosphates are accumulating in a stock tank to allow easy recovery of phosphorus for production of fertilizer.

The activated sludge model ASM3 (Gujer et al., 1999) extended by the EAWAG BioP module (Rieger et al., 2001) was used for the experimental design. The process was tested in two runs: one in seawater and one in freshwater.

4.3 Material and Method

4.3.1 Experimental setup

Two identical setups were run simultaneously under the same experimental conditions (Fig. 4-1). Each setup consisted of a 110 L completely mixed bioreactor (Labelle et al., 2005) and a 220 L stock tank (IB 1801, Bonar plastics, Lindsay, ON, Canada). Each bioreactor was filled with 35 L of plastic carriers (Cascades-1A[®], Koch-Glitsch, Wichita, KS, USA). The bed was moved using a circulation pump (model TE-5-MD-SC, Little Giant Pump Co., Oklahoma City, OK, USA). Water was transferred from the stock tank to the bioreactor by the transfer pump (model AC-4C-MD, March MFG Inc., Glenview, Ill, USA) via the three-way transfer valve (model QAT-CENTREOFF, Chemline Plastic Limited, Thornhill, ON, Canada). The bioreactor was filled with the influent via a corrosion resistant solenoid valve (model W20 Coil, Plast-O-Matic Valves Inc., Cedar Grove, NJ) because the influent pipe was pressurized. A pH probe, an oxidation-reduction potential probe (DynaProII pH and ORP, Broadley-James Corp., Irvine, CA, USA), an oxygen probe (Oxymax W COS61, Endress + Hauser, Burlington, ON, USA) and a UV nitrate analyser (NX 1000, AWA Instrument, Duluth, GA, USA) were installed on the recirculation line.

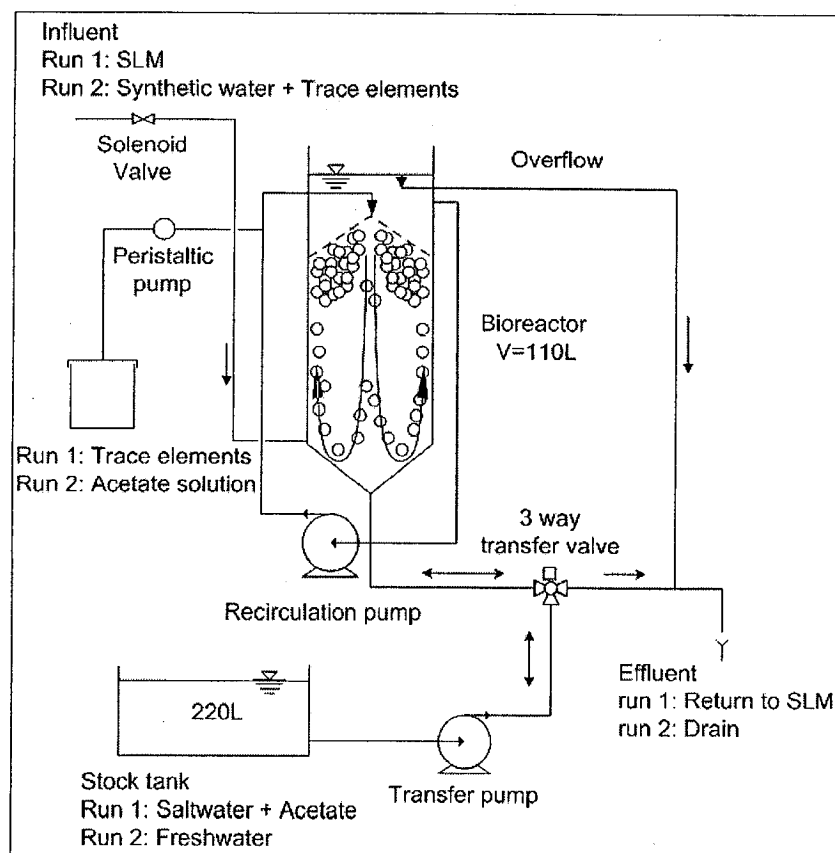


Fig. 4-1 : Experimental setup.

The experiment lasted 450 days during which two runs were done. Run 1 was done with seawater and lasted 174 days. During the first 20 days (period 1-A), the test bench was operated as a sequencing batch reactor to develop a denitrifying biofilm by adding acetate in the bioreactor filled with SLM water. During the remaining 154 days (period 1-B), the biomass was exposed to anaerobic and aerobic/anoxic cycles to favor PAO implantation and BPR activity. Period 1-B started when the denitrifying biofilm was able to denitrify the 70 mg N-NO₃/L found in the SLM water. Run 2 was done in freshwater over a 240 day period. During that run, the reactors were filled with new carriers and were inoculated with sludge from a local wastewater treatment plant.

Table 4-1 : Characteristics of seawater (SLM; n=27) and synthetic freshwater (n=14) based on (*) average values of Montreal freshwater analyzed by the drinking water treatment plant laboratory and () values given by Aquarium Systems for a 28 ppm salinity**

	Units	SLM	Synthetic freshwater
O ₂	mg/L	9.4 ± 0.4	9.0 ± 0.3
Temperature	°C	9.6 ± 0.3	19.8 ± 1.6
pH		7.5 ± 0.1	8.0 ± 0.3
NO ₃ ⁻	mg N/L	69.3 ± 6.7	34.6 ± 3.8
PO ₄ ³⁻	mg P/L	21.8 ± 2.2	14.8 ± 1.2
Ca ²⁺	mg/L	320 **	33 *
Mg ²⁺	mg/L	1,056 **	8.3 *
K ⁺	mg/L	336 **	1.5 * + 8.5

During run 1, trace elements were injected in the bioreactor at the beginning of the aerobic phase using a peristaltic pump (model C/L 77120-52, Cole-Parmer Masterflex, Vernon Hills, IL, USA) so as to obtain concentrations of 150 µg Fe/L, 80µg Mn/L and 10µg Cu/L (Labbé et al., 2003). The acetate was manually added into the stock tank every two days to maintain a concentration over 200 mg COD/L. The stock tank water was replaced every week with fresh seawater prepared using Instant Ocean® (Aquarium Systems Inc., Mentor, OH, USA). Salinity ranged from 25 to 31 g/L in the SLM and from 27 to 32 g/L in the stock tank water.

For run 2, synthetic freshwater was fed into the reactor. This water was prepared using municipal tap water to which phosphate, nitrate and KCl were added (

Table 4-1). Trace elements were also added in the same concentrations as in run 1. During the first 107 days of run 2, acetate was manually added in the stock tank as it had been in run 1. Acetate was then injected directly into the main reactor at the beginning of the anaerobic phase using a peristaltic pump (model L/S 77200-62, Cole-Parmer Masterflex, Vernon Hills, IL, USA) so as to obtain a concentration of 50 mg COD/L in less than one minute. Residual acetate in the stock tank was measured regularly and acetate injection was adjusted accordingly. Stock tank water was replaced with new freshwater every week except twice to test the effect of aging stock tank water.

Table 4-2 : Description of the cycle phases and duration for corresponding runs and periods

Run	Period	Type of Water	Cycle phases						Cycle duration
			Pump transfer (a)	Anaerobic (b)	Gravity transfer (c)	Filling (d)	Aerobic / Anoxic (e)	Emptying (f)	
1	1-A	seawater	-	-	-	15 min	345 min	-	360
	1-B	seawater	5 min	60 to 90 min	15 min	10 min	120 min to 210 min	15 min	225 min to 345 min
2	-	freshwater	5 min	90 min	15 min	5 min	150 min to 180 min	15 min	280 min to 310 min

Except at the startup of run 1 (1-A), cycles were done in six phases (Table 4-2). Each cycle lasted from 225 to 345 minutes. The anaerobic phase varied from 60 to 90 min whereas the aerobic phase varied from 120 to 180 min. All other phase durations were kept constant throughout the experiment.

4.3.2 Theoretical approach

Expected phenomena associated with each phase of the sequencing moving bed biofilm reactor (SMBBR) are presented in Fig. 4-2. It was assumed that no significant biological reactions would occur during the transfer phases a, c and f. During pump transfer (phase a), anaerobic water would be transferred from the stock tank to the

reactor via the three-way transfer valve. The biomass would reach full poly-P capacity and would be devoid of PHA. The concentration of phosphate in the stock tank water would vary with the number of cycles because the biomass would release phosphates in that water. During the anaerobic phase (b), acetate uptake would occur to refill the PHA pool, and the poly-P pool would be used as the energy source. Phosphates would be released and their concentration in the anaerobic water would increase. At the end of the anaerobic phase, the water would be returned by gravity to the stock tank (c). During the filling phase (d), SLM (run 1) or synthetic wastewater (run 2) would fill the bioreactor. The biomass would still be at full PHA capacity, and concentrations of phosphate, nitrate and oxygen would rise to the average values of water to be treated. During the aerobic phase (e1), oxygen and PHA would be consumed to refill the poly-P pool. During the anoxic phase (e2), the same processes would occur but according to Kuba et al. (1996), the kinetic parameters would be lower than in the aerobic phase. At the end of these two phases, the concentrations of phosphate, nitrate and oxygen would be very low in the bioreactor. During the emptying phase (f), the treated water was returned to the SLM (run 1) or flushed down to the drain (run 2).

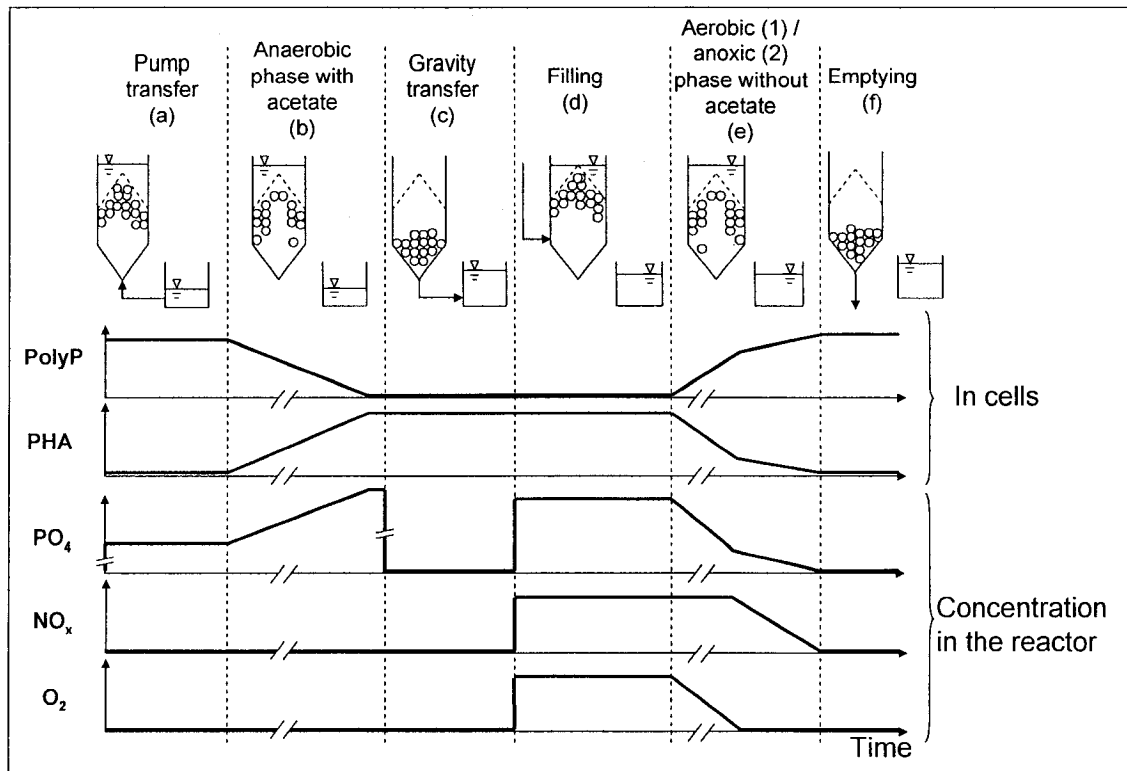


Fig. 4-2 : Expected changes in parameters during SMBBR phases.

4.3.3 Set-up of mathematical model

A model of the pilot plant was developed in the WEST[®] simulation package (MOSTforWATER, Kortrijk, Belgium) in order to determine the general feasibility of the process. The goal was to use the model to help evaluating the process limitations and to design the experiments and not to predict the exact behavior of the process under development. The model used was ASM3 (Gujer et al., 1999) extended by the EAWAG BioP module (Rieger et al., 2001) with parameters according to Koch, Kuhni, Gujer, & Siegrist (2000) and Rieger et al. (2001). The configuration mimicked the experimental setup characteristics in terms of volumes, flow rates, and influent characteristics.

A controller (Fig. 4-3) drove cycling by switching between different states depending on different conditions (timers, filling ratio or concentrations). The bioreactor (BR) was a *pumped volume with separation phase activated sludge unit* to mimic the biofilm

reactor. All biomass was retained in the reactor until the concentration reached the $1,800 \text{ gTSS/m}^3$ set point, at which point the controller started disposing of the sludge. The SLM and stock tank (ST) were *pumped volume activated sludge units*. To mimic the anaerobic reactor, k_{La} of the ST was set to 0. Volumes were respectively of 114 m^3 for BR, 220 m^3 for ST and $3\,250\,000 \text{ m}^3$ for SLM

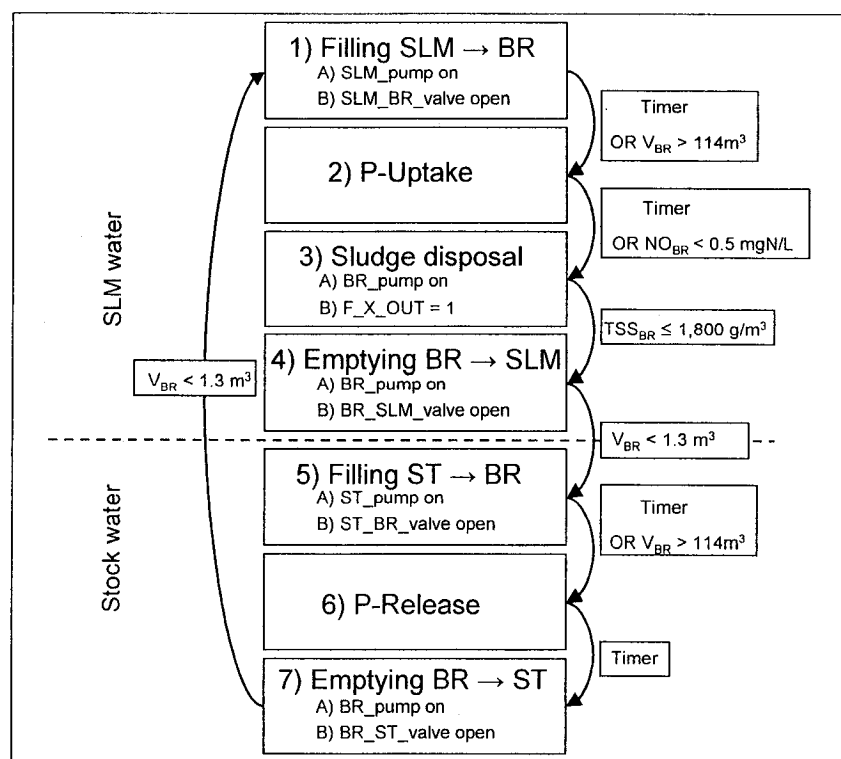


Fig. 4-3 : Phase controller for the mathematical model.

BR is a pumped volume activated sludge reactor with separation phase. A pump (BR_pump) empties the reactor and a parameter F_{X_OUT} defines the fraction of biomass which is emptied with water (default value = 0). V_{BR} , NO_{BR} and TSS_{BR} are the volume of water, the nitrate and the total suspended solids concentrations in BR. SLM and ST are pumped volume activated sludge reactors. Each reactor has a pump which empties it (SLM_pump and ST_pump). Flow rates between SLM, BR and ST are controlled by valves (SLM_BR_valve, BR_SLM_valve, ST_BR_valve and BR_ST_valve). (The programming code is available by making a request to the authors of this study).

4.3.4 Physico-chemical analyses

Total phosphorus, orthophosphates, nitrite and nitrate were measured according to methods 4500-P-G and 4500-NO₃--I of the Standard Methods (APHA et al., 1998). Cycles were characterized by sampling reactor water every 15 min during anaerobic and anoxic/aerobic phases. Stored samples were pressure filtered through a 0.45 µm filter and frozen prior to analysis. Analyses of PO₄³⁻ and NO_x were done using an automated ion analyzer (Model Quickchem 8500, Lachat Instruments Inc., Loveland, CO, USA). Hach test kits were used during on-site measurement.

Biomass analyses were measured after sonicating three plastic carriers (VCX 750 Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA). To prevent biomass loss from filtration, total solids (TS) and total volatile solids (TVS) were measured at 105°C and 550°C, respectively. At the end of run 2, precipitates on carriers and pipes were identified by X-ray diffraction (X'PERT, Philips) and energy dispersive spectrometry using a scanning electron microscope (JSM840, JEOL).

4.3.5 DNA extraction and PCR

Biomass was scraped from two plastic carriers, put in sterile water and centrifuged. The biomass was then washed several times with deionized water, lyophilized for 24h and stored at room temperature. DNA was extracted from the lyophilized biomass as described by Labbé et al. (2004).

PCR amplifications were performed in a 50-µL reaction volume with 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 µg bovine serum albumin, 200 µM dNTP, 10 pmol of each primer, DNA (50-100 ng) and 2.5 U of Taq DNA polymerase (GE-Healthcare Bio-Sciences Inc, Baie d'Urfé, QC, Canada). Amplifications were then done at 94°C for 5 min, 53°C for 5 min, followed by 30 cycles at 72°C for 45 sec, 94°C for

45 sec, 53°C for 45 sec, and finally an extension period of 10 min at 72°C. Primers targeted a 16S ribosomal RNA sequence that is specific to *Candidatus Accumulibacter phosphatis* and *Competibacter* sp.: PAO462f (GTT AATACCCTGWGTAGATGACGG) and PAO846r (GTTAGCTACGGCACTAAA AGG), and GAOQ431 (TCCCCGCCTAAAGGGCTT) and GAOQ989 (TTCCC CGGATGTCAAGGC) (Ahn et al., 2007; Crocetti et al., 2000). The specific *Candidatus A. phosphatis* PCR signal (PAO462f/PAO846r) generated a 384 bp fragment, and specific *Competibacter* sp. PCR signal (GAOQ431/GAOQ989) generated a 558 bp fragment. PCR products were migrated by electrophoresis on agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized by UV.

4.4 Results

4.4.1 Modeling

According to the prediction of the ASM3 with the EAWAG Bio-P module, the biomass would be enriched with PAOs during period 1-B (Fig. 4-4). This enrichment would be sufficient to remove the total phosphorus content (22 mg P/L) in the influent. The PAOs would become more abundant than the OHOs after only 17 days, and the system would reach a steady state after 30 days. Steady state would correspond to the total removal of phosphorus during one cycle. In order to achieve total BPR, 6 mg NO₃-N / L and 60 mg COD / L are needed. In other words, the model predicted that complete denitrification of wastewater from the SLM could not be achieved through EBPR with the proposed set-up.

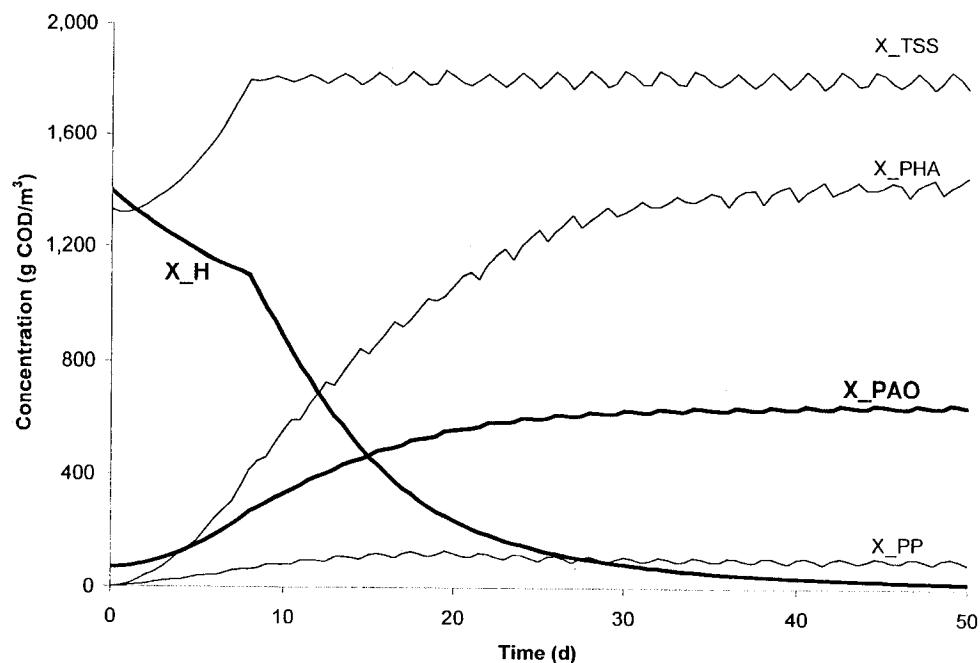


Fig. 4-4 : Changes in simulated biomass components from the experimental state at the beginning of period 1-B until quasi steady state.

All concentrations are expressed as gCOD/m³ (X_TSS: particulate Total Suspended Solids; X_H: particulate OHOs; X_PAO: particulate PAOs; X_PHA: particulate PHA; X_PP: particulate PolyP).

4.4.2 Experimental results

In both runs 1 and 2, strict anaerobic conditions were reached in the stock tank water four cycles after its weekly replacement. Apart from these first four cycles, the biomass was never in presence of both the electron donor and the electron acceptor during the week.

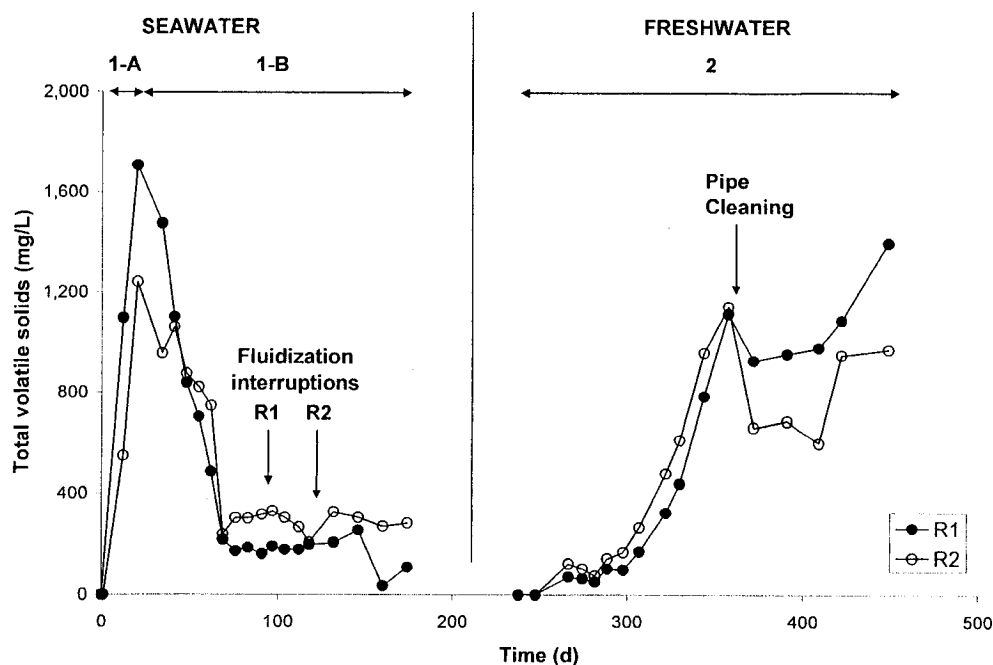


Fig. 4-5 : Changes in experimental biomass during runs 1 and 2 in R1 and R2. Fluidization was interrupted during run 1 to favor the biomass growth on days 91 for R1 and 118 for R2. Fluidization restarted at the beginning of run 2 until it stopped again because pipes were clogged with biomass. Pipe cleaning allowed fluidization recovery.

Seawater (run1): The biomass varied greatly during the runs (Fig. 4-5). During period 1-A (compare Table 2) the biofilm grew under denitrifying conditions to reach 1,708 mg TVS/L for reactor 1 (R1) and 1,240 mg TVS/L for reactor 2 (R2). During period 1-B, there was a major decrease in the attached biofilm that stabilized after 70 days for both reactors, with TVS averaging of 174 mg/L for R1 and 289 mg/L for R2. To allow biomass growth on the carriers and to prevent the biomass from detaching, fluidization was stopped. However, no increase in the biomass was observed.

Freshwater (run 2): During run 2, the biofilm grew exponentially (Fig. 4-5). On day 358, fluidization stopped in both bioreactors because the pipes were clogged with biomass. After pipe cleaning and fluidization recovery, TVS dropped, stabilized for 64 days and increased again until the end of the experiment.

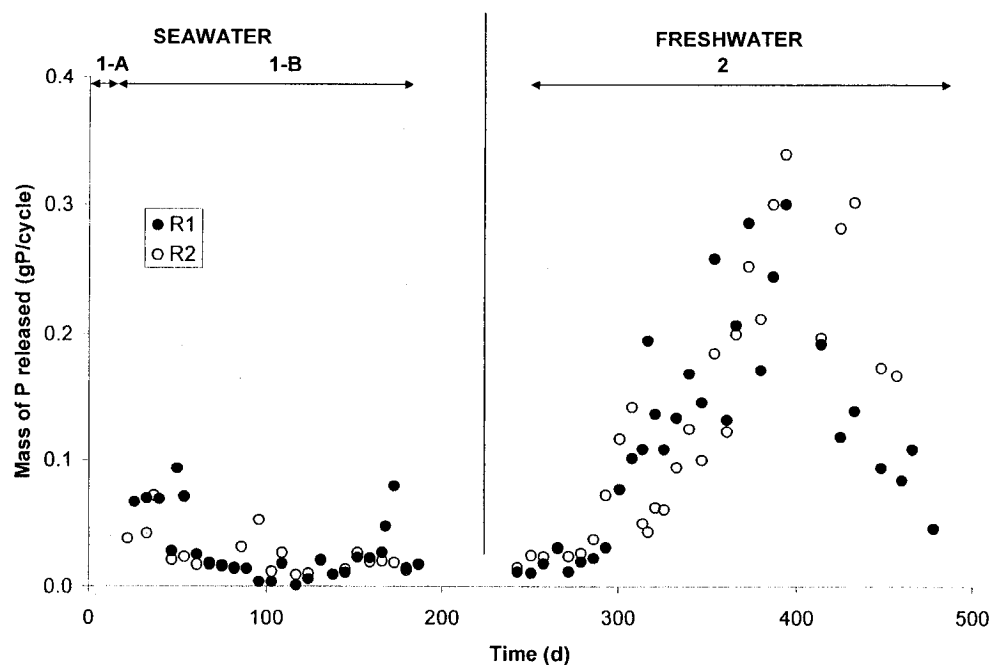


Fig. 4-6 : Mass of phosphorus released in the stock tank per cycle based on the final phosphate concentration in the stock tank before water changing divided by the number of cycles carried out.

The phosphates released in the stock tank accumulated in freshwater but not in seawater (Fig. 4-6). During period 1-B, the mass of released phosphates never exceeded 0.09 g P / cycle. During run 2, phosphates released in the stock tank per cycle increased over 150 days till 0.3 and 0.34 g P/cycle for R1 and R2 respectively, and decreased until the end of the run. The drop was greater for R1 than R2 possibly because of technical problems that rendered alternation of anaerobic and aerobic/anoxic conditions difficult. BPR was also observed a typical cycle of run 2 (Fig. 4-7). The release of phosphate was observed during the anaerobic phase, with the concentration rising from 54.8 mg P/L to 59.2 mg P/L. For this specific cycle, the stock tank water was 6 days old which means that phosphate accumulated during 30 cycles and which explains the high concentrations of phosphate. The oxygen and nitrate concentrations were nil, indicating that the anaerobic conditions were reached. During the aerobic phase, the concentration of phosphate decreased from 14.2 mg P/L to 9.5 mg P/L, which translates into a

phosphorus removal efficiency rate of 33%. Oxygen dropped from 6.4 mgO₂/L to 0.3 mgO₂/L and nitrates decreased from 28.2 mgNO₃-N/L to 24.9 mgNO₃-N/L.

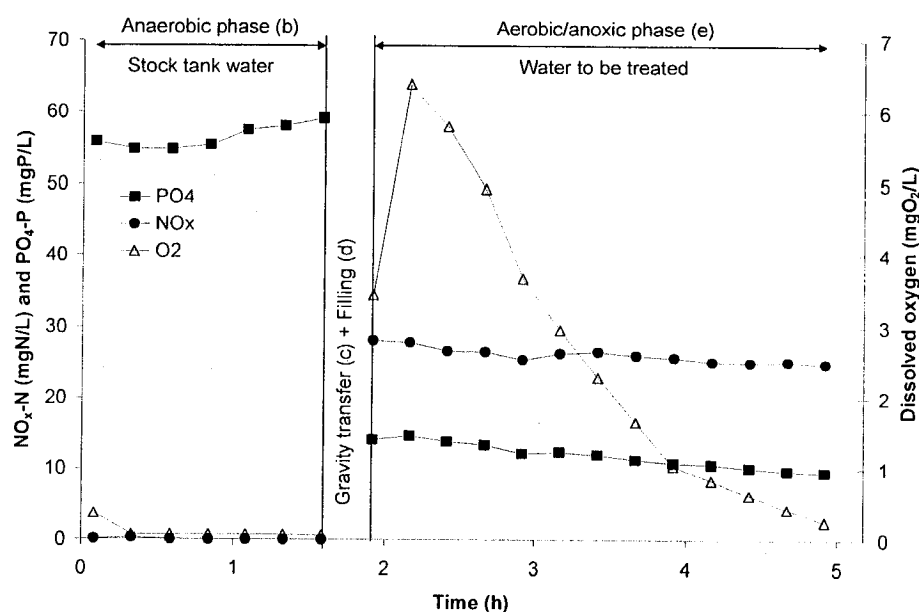


Fig. 4-7 : Concentrations of nitrate, phosphate and oxygen in bioreactor during a typical cycle of the run 2 (freshwater)

The phosphorus mass balance showed that the process achieved BPR in freshwater during run 2 (Fig. 4-8). The mass balance was over 98.5% for the two reactors. Between days 361 and 460, the biomass was quite stable in both bioreactors, and BPR could therefore be quantified by calculating a mass balance for phosphorus over the bioreactor and the stock tank. These calculations were based on analyses performed on 52 days of cycles for R1 and 49 days for R2. Total phosphorus removal was based on the quantity of phosphorus accumulated in the stock tank plus the phosphorus on carriers. The latter was composed of the phosphorus contents of the biomass produced (estimated as 2% of TVS) and of hydroxyapatite precipitated, which was determined by X-ray diffraction. The phosphorus precipitated on carriers was determined by multiplying the average mass of hydroxyapatite produced per cycle by the number of cycles accounted for in the mass balance. Phosphorus removal rates of 20 and 23 % were observed in R1 and R2

respectively, with a BPR accounting for 77% in R1 and 81% in R2. Biomass removal at the end of the aerobic phase was very low (1.47 mg VSS/L for R1 and 1.73 mg VSS/L for R2). For this process, BPR was therefore not achieved by biomass removal but rather by phosphorus transfer from the bioreactor to the stock tank.

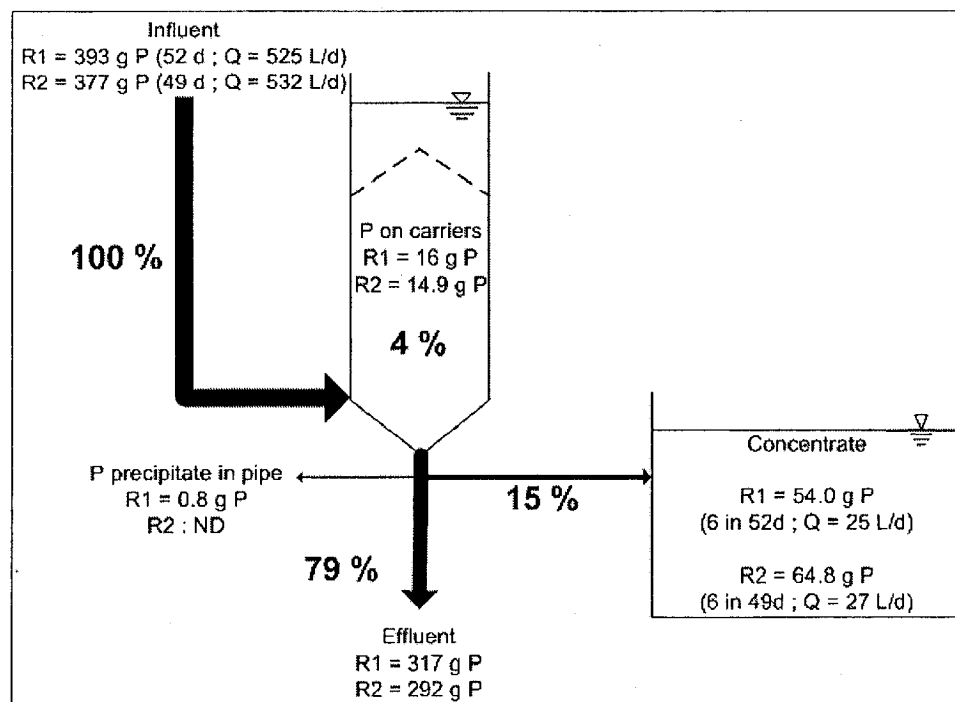


Fig. 4-8 : Phosphorus mass balance for R1 and R2 during freshwater run. Percents are expressed as the mean of the two reactors

Finally, the presence of PAOs was verified in both reactors. In freshwater conditions, the PAO Candidatus *Accumulibacter phosphatis* was detected in the biofilm using 16S rRNA gene sequences specific for this bacterial species (data not shown). The GAO *Competibacter* sp. was not detected. Neither PAOs nor GAOs were detected in seawater conditions.

4.5 Discussion

4.5.1 Seawater run

Results showed that it was not possible to achieve Bio-PN in seawater using the same process as for freshwater. Furthermore, PAOs did not grow in seawater as shown by microbial measurements. The SLM's temperature and pH conditions should have promoted PAO growth. Other experiments indicated that biomass activity was not affected by the presence of soluble metabolic products accumulated in the stock tank after one week (data not shown) and the results obtained during run 2 in freshwater proved that the process which accumulates phosphates in the stock tank was not responsible for the lack of efficiency in seawater.

Seawater contains high concentrations of calcium, potassium and magnesium (Table 1). Different studies have demonstrated that several ions in the form of poly-P counterions are essential for BPR (Pattarkine & Randall, 1999; Schonborn, Bauer, & Roske, 2001). In freshwater, Comeau et al. (1986) and Rickard & McClintock (1992) proposed that K/P and Mg/P molar ratios have to be higher than 0.2 and 0.3 respectively, to favor BPR. In these different studies, calcium variations between anaerobic and aerobic conditions were not significant. Furthermore Schonborn et al. (2001), Liu, Lin & Tay (2005) and Barat, Montoya, Borrás, Seco & Ferrer (2006) suggested that high calcium concentrations produce "inert" Ca-stabilized poly-P which seemed very stable when anaerobic and aerobic/anoxic conditions were alternated and which was unavailable for phosphorus exchange. Calcium concentrations tested by those authors were about 100 mg Ca/L whereas calcium concentration in seawater is about 400 mg Ca/L. In the present study, Ca/P, K/P and Mg/P ratios were 11.4, 12.3 and 61.8, respectively. This suggests that when the calcium concentration is high, the exchange of phosphates is blocked and PAO growth is limited, even if magnesium and potassium levels are high as well.

4.5.2 Performance in freshwater

The results showed that the process can biologically remove phosphorus in freshwater but the efficiency was lower than predicted by the model and was limited to 23%. Different studies reported that the efficiency of MBBRs for phosphorus removal was between 60 and 98% with similar P-loadings (Helness & Odegaard, 1999; Rogalla et al., 2006). In the present study, the low efficiency of the process in freshwater cannot be attributed to GAOs since no *Competibacter* were found in the freshwater run. For run 2, a synthetic influent similar to the SLM water was used to test the impact of salinity. The composition of the influent was very poor in nutrients compared to other studies done with synthetic wastewater (Kuba et al., 1996; Smolders, van der Meij, van Loosdrecht, & Heijnen, 1994). Smolders et al. (1994) used a synthetic influent containing yeast extract and a nutrient solution containing elements such as B, I, Mo, Zn and Co. In order to focus the present study on the impact of salts, the influent did not contain yeast or that nutrient solution. SLM water was prepared as usual by using municipal tap water and adding Instant Ocean. The synthetic freshwater influent was therefore prepared by using municipal tap water and adding phosphate and nitrate in order to mimic SLM water without salts. Adding yeast extract and nutrients could increase the efficiency of the process, but this remains to be tested.

Another element that is commonly added in synthetic influent is ammonia. N-source in the synthetic freshwater influent was provided by nitrate. From other studies (Barker & Dold, 1997) it is known that some heterotrophic organisms can switch from ammonia to nitrate as nitrogen source if no or very little ammonia is present. Labelle et al. (2005) showed that it was possible to achieve marine denitrification without ammonia, and the present study demonstrated that BPR activity (in freshwater) could be achieved without ammonia as N-source. However, the addition of ammonia to the synthetic influent should also improve the biological efficiency of the process.

The SMBBR with sequential water exchange was a very selective process for PAOs as it did not allow for the simultaneous presence of both the electron donor and acceptor, except for four cycles at the beginning of the week. This implies that the process did not favor the growth of OHOs. The purpose of most EBPR processes is to remove carbon, nitrate and phosphorus (Oehmen et al., 2007) and therefore favor the growth of OHOs. In the process described here, the main goal was to remove phosphorus, and concurrently, nitrate, but not carbon. Garcia Martin et al. (2006) showed that some key genes are missing in *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in order to complete the Entner-Dudoroff (ED) pathway, which is involved in glycogen degradation. This may mean that *Accumulibacter* spp. cannot complete every step of the metabolic pathway for BPR on its own and that it therefore needs to interact with other strains or species to do so. A possible explanation for the low efficiency measured in the freshwater run could therefore be that the process was too selective and that it constrained the growth of heterotrophic biomass which is necessary for symbiotic reactions to occur with PAOs.

4.6 Conclusions

A sequencing moving bed biofilm reactor (SMBBR) sequentially exchanging two water types can be used to transfer phosphorus from a polluted freshwater effluent to a stock tank. It should prove useful in closed systems (e.g. fish farms) and in situations where a P-free effluent is needed. In freshwater, a phosphorus removal efficiency rate of 20% was obtained of which 80% was attributed to biological removal and 20% to chemical precipitation. The process was therefore not responsible for the seawater run failure. High calcium levels in seawater are suspected to prevent biological phosphorus removal. The efficiency of the process could be increased by adding yeast extract and nutrients commonly used in synthetic wastewater. It could also benefit from a slight addition of carbon to the aerobic/anoxic phase so as to favor the PAO-OHO symbiosis.

4.7 Acknowledgements

This research was financially supported by a grant to Richard Villemur from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by the Montreal Biodome. We would like to thank the technical staff of the Montreal Biodome for their technical assistance, Denis Bouchard of École Polytechnique de Montreal for analytical assistance, and Florent Chazarenc and Majdala Mansour-Geoffrion for helpful discussions.

CHAPITRE 5

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Ce chapitre a pour objet de présenter des résultats qui permettent de compléter ceux présentés au chapitre 4 afin d'appuyer la discussion qui sera présentée au chapitre 6. À cet effet une première partie présentera un essai de respirométrie réalisé afin de vérifier que le bac de concentrat n'était pas la source de l'absence de croissance de biomasse en eau de mer. Par la suite les résultats complémentaires de la modélisation permettront de comparer la biomasse obtenue en eau douce avec les prévisions du modèle. Finalement, une dernière partie présentera les caractéristiques de la biomasse obtenue durant l'expérimentation en eau douce afin de pouvoir comparer le système à ceux trouvés dans la littérature.

5.1 Respirométrie en eau de mer

L'objectif de cet essai était de voir si l'âge du concentrat importait et si l'absence d'ammoniac nuisait à l'activité bactérienne. Un test de respirométrie a alors été réalisé pour vérifier que les bactéries du biofilm étaient bien actives en présence du concentrat et avec les nitrates comme seule source d'azote. Le test a duré 3 jours et a été fait en duplicata. La Fig. 5-1 présente la comparaison entre les consommations d'oxygène pour les conditions suivantes :

- SLM avec ajout de 2000 mg DCO/L et
- concentrat filtré avec 70 mg N-NO₃/L et 1500 mg DCO/L.
- concentrat filtré sans source d'azote ajoutée et avec ajout de 1500 mg DCO/L
- témoins (SLM et concentrat non filtré sans biomasse ajoutée)

Sur cette figure on constate que les courbes « SLM + Acétate » et « conc. + N + Acétate » ont la même allure, elles présentent une courbe exponentielle jusqu'à

l'atteinte d'un plateau suite à la consommation complète du substrat. Le témoin contenant l'eau du SLM sans biomasse ajoutée montre une respiration quasiment nulle confirmant l'absence de biomasse et de source de carbone dans l'eau du SLM. Le témoin contenant l'eau non filtrée du concentrat sans ajout de biomasse ne montre qu'une faible respiration indiquant un résidu de biomasse et de substrat dans le concentrat utilisé. L'activité de la biomasse a été similaire entre l'eau de concentrat et l'eau du SLM. Ces résultats montrent que l'eau du concentrat n'est pas un obstacle à l'activité bactérienne.

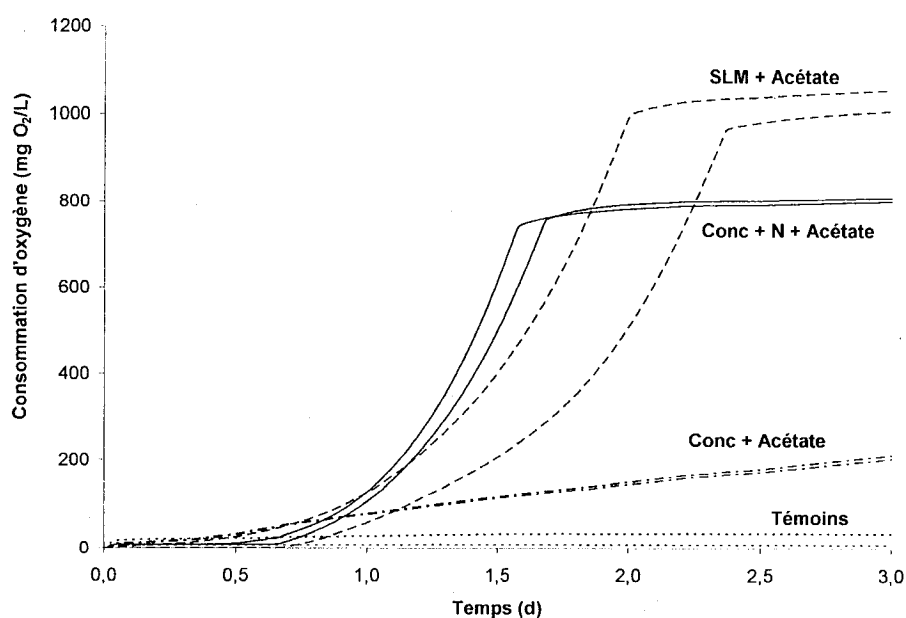


Fig. 5-1 : Consommation d'oxygène pour le SLM et le concentrat avec et sans source d'azote ajoutée

D'autre part on observe que les courbes « Conc. + Acétate » présentent une pente régulière. Les deux concentrats utilisés étant identiques, la respiration supplémentaire pour les courbes « conc. + N + Acétate » a donc été causée par les nitrates ajoutés. Ceci montre que les bactéries du biofilm sont capables d'utiliser les nitrates comme seule source d'azote. L'absence d'azote ammoniacal dans l'eau n'est donc pas un obstacle à

la croissance du biofilm. Il faut donc rechercher ailleurs que dans l'âge du concentrat et l'absence d'ammoniac la cause de la non déphosphatation biologique en eau de mer.

5.2 Modélisation d'un cycle avec le module ASM3 et le module BioP de l'PEAWAG

Les fluctuations de la biomasse produites par le modèle ont été discutées dans le chapitre 4. La présente section vise à montrer les performances du procédé prédites par le modèle.

Après une simulation de 30 jours pour atteindre le régime permanent du système et une concentration stable de biomasse, une simulation de 7 jours a été réalisée avec un concentrat neuf. Le modèle prédit une efficacité rapide et importante en ce qui concerne l'enlèvement des phosphates (Fig. 5-2). L'enlèvement total des 21,8 mg P / L présents dans l'affluent est théoriquement réalisé en 1h27 : 8,8 mg P / L sont consommés en 30 min de phase aérobie, et 13 mg P / L sont consommés en 60 min de phase anoxie. Lors de la phase anoxie 5,6 mg $\text{NO}_3\text{-N}$ / L sont consommés. Dans la phase anaérobie suivante, la consommation d'acétate est de 61,5 mg DCO / L pour un relargage de 17 mg P / L soit un taux de 0,29 mol P relargué / mol C assimilé. La concentration en MES étant réglée 1800 mg/L (1500mgMVES/L pour $\text{IVT}=0,8$), ceci représente un ratio de 0,011 g P/g MVES. Ce taux est faible comparativement à la littérature qui donne des valeurs de 0,15 à 1,52 mol Prelargué/mol Cstocké (Mino et al., 1998). Enfin, le procédé consomme 2,8 mg DCO/g P enlevé.

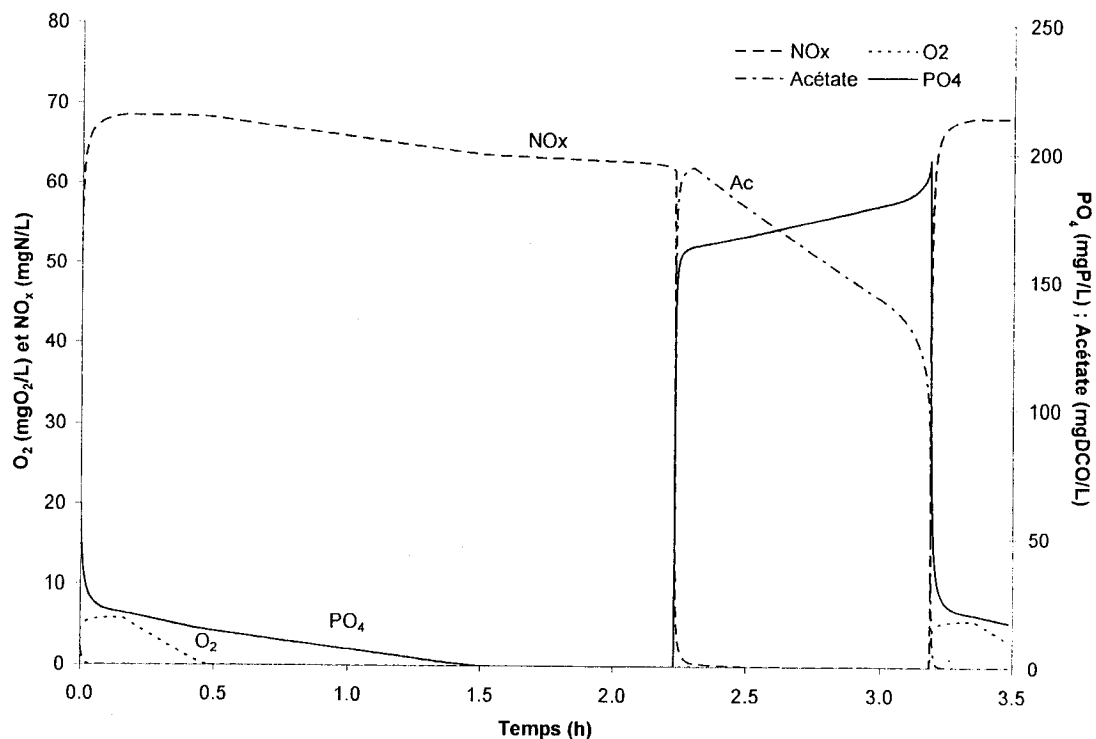


Fig. 5-2 : Concentrations prédites par le modèle en phosphate, nitrate, oxygène et acétate modélisé durant un cycle après avoir atteint le régime permanent.

La concentration en phosphate atteinte dans le concentrat en une semaine est très élevée puisqu'elle atteint 230 mg P/L (Fig. 5-3). Cette concentration est légèrement abaissée par l'eau de dilution apportée pour compenser les pertes de volume. La concentration élevée semble légèrement influencer le relargage qui reste tout de même efficace mais qui diminue de 3 mg P/L sur la totalité de la semaine simulée.

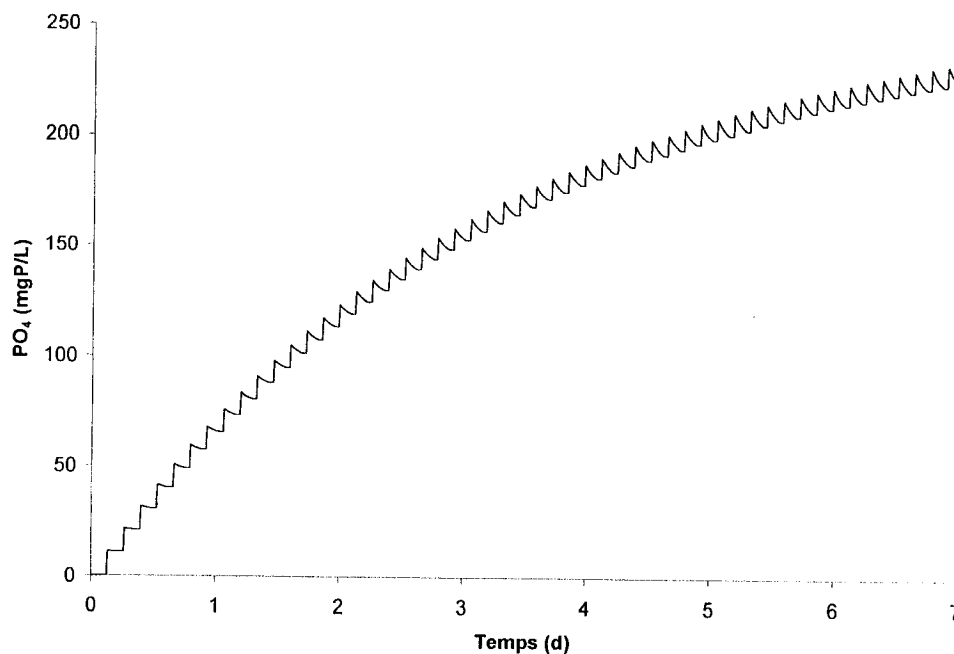


Fig. 5-3 : Concentration en phosphates accumulés dans le bac de concentrat au cours d'une semaine après avoir atteint le régime permanent tel que prédite par le modèle.

5.3 Caractérisation de la biomasse

La caractérisation de la biomasse en eau douce a été réalisée grâce aux suivis de cycle (Tableau 5-1). Les ratios $P_{\text{relargué}}/\text{DCO}_{\text{assimilé}}$ sont assez faibles comparativement à ceux produits par les boues activées, plutôt situés entre 0,4 et 0,7 mol P / mol C (Mino et al., 1998). Mais ils sont comparables à ceux déterminés par la modélisation. En revanche on constate que la consommation de substrat est beaucoup plus importante que prévu par rapport au phosphore assimilé. Les valeurs moyennes obtenues étaient respectivement de 0,21 et de 0,19 mol P / mol C pour R1 et R2. En ce qui concerne la consommation du substrat on constate qu'elle est deux fois plus importante que celle prédite par le modèle avec une consommation moyenne de 6,7 g DCO/gP assimilé pour R1 et de 6,2 g DCO/gP assimilé pour R2. Ces deux caractéristiques semblent assez fluctuantes d'un cycle à l'autre ce qui suggère une instabilité de la biomasse.

On peut également constater que la masse de phosphore assimilée est équivalente à la masse de phosphore relarguée. Ceci montre encore que l'efficacité du procédé réside dans sa capacité à réaliser un échange de phosphates entre l'eau à traiter et le bac de concentrat qui est extérieur au circuit fermé.

CHAPITRE 6

DISCUSSION GÉNÉRALE INTÉGRÉE

6.1 Impossible de réussir la déphosphatation en eau de mer ?

Il a été démontré dans le chapitre 4 que le procédé n'était pas efficace en eau de mer et qu'il n'avait même pas permis de développer une biomasse en alternant les conditions anaérobie et aérobie. D'autre part, les essais de respirométrie sur un concentrat vieux d'une semaine ont exclu la possibilité d'une inhibition par la présence de sous-produits métaboliques ou par l'absence d'ammoniac. Enfin en eau douce, le procédé a montré sa capacité à réaliser de la déphosphatation biologique, même si les rendements présentés étaient faibles par rapport à ceux que l'on peut retrouver dans la littérature. L'absence de croissance de biofilm n'est donc pas imputable au procédé lui-même.

Le Tableau 2-1 montre que l'eau de mer du SLM comporte de fortes concentrations en ions calcium, magnésium et potassium. Dès les premières études sur la déphosphatation biologique (Comeau et al., 1986), l'importance de ces cations a été mise en évidence. Des ratios minimums de K/P et Mg/P respectivement de 0,2 et 0,3 ont ainsi été déterminés.

D'autres études ont montré que plusieurs ions sont transportés en même temps que les phosphates à travers la membrane cellulaire. Ainsi, Pattarkine & Randall (1999) ont observé un relargage de calcium, de magnésium et de potassium en même temps que les phosphates. Si seuls le potassium ou le magnésium étaient disponibles, l'absorption des phosphates n'atteignait respectivement que 22% et 41% de la valeur du contrôle. Si les deux étaient disponibles, l'absorption atteignait 82%. Ces résultats montrent que le

potassium et le magnésium sont tous deux indispensables à la déphosphatation biologique. En ce qui concerne le calcium, il est relargué en très faible quantité et n'est quasiment pas réabsorbé par la suite et ce, que ce soit en présence du seul potassium, du seul magnésium ou des deux ions. Il semblerait donc que le calcium n'intervienne pas dans la régulation des échanges transmembranaires des phosphates.

Schonborn et al. (2001) ont analysé les granules de poly-P et ont montré qu'il en existait au moins sept suivant la nature et le nombre de cations associés (Mg, K, Ca, Mg/K, Mg/Ca, K/Ca et Mg/Ca/K). L'importance de ces sept types était fonction de la prédominance des cations dans l'affluent d'un procédé EBPR. Les auteurs ont amélioré la déphosphatation biologique en ajoutant du calcium mais ils ont aussi obtenu une plus grande variabilité des performances. En ajoutant seulement du magnésium, ils ont aussi amélioré la déphosphatation biologique et ce de façon stable. Schonborn et al. (2001) ont combiné leurs résultats à ceux de Pattarkin & Randall (1999) et en ont conclu que les granules de poly-P qui étaient disponibles pour le transport transmembranaire étaient stabilisées par le potassium ou le magnésium, mais non ceux stabilisés par le calcium. La répartition de ces types de granules serait alors dépendante des rapports Ca/P, Mg/P et dans une moindre mesure du rapport K/P.

En eau de mer les concentrations en calcium, magnésium et potassium sont très élevées et les rapports entre ces ions présents et le phosphore sont largement supérieurs aux rapports recommandés dans de la littérature. A priori, l'effet de ces concentrations aurait donc dû être positif pour la déphosphatation biologique. Cependant, la concentration de l'eau de mer en calcium est environ quatre fois plus élevée que les teneurs testées par Schonborn et al. (2001). Il est alors possible que le calcium stabilise petit à petit la totalité des granules présentes dans les OAP et qu'il n'y ait plus d'échanges transmembranaires possibles. Selon Oehmen et al. (2007), les récentes recherches pour éclaircir les mécanismes de transport des AGV à travers la membrane démontrent un transport actif des AGV. L'énergie nécessaire à ce transport serait

fournie par la force motrice des protons. Pour générer cette force, une des voies est l'éjection d'un proton et d'un phosphate par un transporteur transmembranaire (« *Pit transporter* »). Par conséquent, si les phosphates ne sont plus disponibles pour les échanges avec l'extérieur de la cellule, parce que stabilisés par le calcium, la cellule ne peut plus faire de transport actif d'AGV et ne peut pas croître.

Il serait intéressant de tester la déphosphatation biologique avec une eau de mer sans calcium pour vérifier l'influence particulière du calcium. Cette expérience permettrait de déterminer le rôle du calcium sur la déphosphatation biologique et de tester la faisabilité de la déphosphatation biologique en eau de mer.

6.2 Comparaison modélisation/expérimentation

Le procédé développé pour ce projet a montré une efficacité en eau douce mais pas à la hauteur de ce que prévoyait le modèle. Il faut toutefois nuancer les résultats de la modélisation. En effet le modèle a été développé en boues activées car il n'existe pas encore de modèle efficace en biofilm. Il est donc évident que plusieurs paramètres ne sont pas représentatifs du procédé tels que les phénomènes de diffusion dans un biofilm et donc d'accès au substrat (Metcalf & Eddy, 2003). Les caractéristiques de développement des OAP sont tout de même valables et le fait que le procédé permette de développer une biomasse déphosphatante n'est pas à remettre en question. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé par l'essai en eau douce.

Le modèle a également prédit une efficacité de déphosphatation importante qui pourrait amener un enlèvement rapide des phosphates. En effet, une fois en régime permanent le procédé est théoriquement capable d'éliminer les 21,8 mg P/L de l'affluent en 1,5 h de phase de remplissage et d'aérobic. Il y aurait donc 35 min de trop pour la phase aérobic. Il serait alors possible de réduire la phase aérobic d'augmenter le nombre de cycles par jour et ce faisant d'augmenter le taux journalier d'enlèvement des phosphates.

Dans la pratique, l'efficacité du procédé n'a pourtant pas montré les mêmes capacités de déphosphatation. Plusieurs paramètres ne sont pas apparus comme optimaux suite à l'essai en eau douce. Premièrement, l'affluent synthétique qui a été utilisé pour tester le procédé en eau douce avait pour objectif d'imiter le SLM sans les sels. Le calcium, le magnésium et le potassium ont été ajoutés à cette eau de telle sorte que les ratios déterminés par la littérature soient respectés (Comeau et al., 1986). Néanmoins, la plupart des études réalisées avec des effluents synthétiques se réfèrent à la recette utilisée par Smolders et al. (1994). Cette recette comporte plusieurs éléments qui étaient absents de la présente étude. Ainsi le bore, l'iode, le molybdate, le zinc, le cobalt et des extraits de levures sont des éléments qui manquent à l'affluent synthétique. Ces éléments pouvant se révéler essentiels pour la performance des OAP, il serait important d'expérimenter le procédé avec un affluent conforme à la recette de Smolders et al. (1994).

Un autre point est le ratio C/P utilisé. Lors du développement du biofilm, l'acétate était ajouté manuellement dans le bac de concentrat pour faciliter la mise en œuvre. Après le développement du biofilm, la consommation moyenne d'acétate, calculée lors de la première phase, a déterminé la masse d'acétate à injecter dans le réacteur, soit 50 mg / L. La mesure régulière de la DCO résiduelle dans le bac de concentrat permettait de s'assurer que l'injection d'acétate était suffisante. S'il y avait accumulation d'acétate dans le bac de concentrat, c'est que la biomasse ne consommait pas la totalité de l'acétate présent. Cette condition a toujours été observée.

Selon Oehmen et al. (2007), plusieurs études ont montré qu'un rapport DCO/P faible (10-20 mg DCO/mg P) favorisait la croissance des OAP au détriment des OAG. Les analyses de DGGE et de FISH réalisées parallèlement à ce projet à l'INRS-Institut Armand Frappier ont par ailleurs montré la présence de *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (affilié aux OAP) et confirmé l'absence de *Competibacter* sp. (affilié aux

OAG). Il semble donc que les conditions utilisées aient effectivement favorisé la croissance des OAP au détriment des OAG.

A l'inverse si on compare les ratios moyens $P_{\text{relargué}}/\text{DCO}_{\text{assimilée}}$ obtenus lors des suivis de cycle (Tableau 2-1) avec ceux que l'on trouve dans la littérature (Tableau 2 de Oehmen et al., 2007), on constate qu'ils sont comparables à des systèmes dominés par les OAG. Ce rapport serait fonction de la proportion entre les OAP et les OAG, puisque seuls les premiers relarguent des phosphates. Enfin les valeurs données par le modèle en termes de phosphates relargués par unité de biomasse donne des résultats deux fois plus importants que les résultats expérimentaux. Comme le réacteur fonctionnait en biofilm, ce ratio est sous estimé car la fraction de matières volatiles qui sert à la structure du biofilm est plus grande qu'en boue activée et ne participe pas au relargage.

D'une manière générale, les caractéristiques de la biomasse développée en eau douce sont conformes à celles d'une biomasse déphosphatante. Il est alors possible que, la biomasse formant un biofilm, la concentration en acétate dans le réacteur ne permette pas d'établir un gradient suffisant pour que l'acétate pénètre jusqu'aux couches profondes du biofilm. Les résultats préliminaires des expériences actuellement menées au Laboratoire Régional des Sciences Aquatiques (LARSA) de l'Université Laval avec un effluent de pisciculture réel semblent corroborer cette remarque (Juan Restrepo, communication personnelle).

Finalement le dernier point qui pourrait être en cause dans la faible efficacité du procédé par réacteur séquentiel à biofilm en lit mobile avec bac de concentrat est sa grande sélectivité vis-à-vis des OAP. En effet, dans la mesure où il n'y a pas de carbone organique dans l'effluent synthétique à traiter, il n'y avait pas de possibilité pour des organismes hétérotrophes ordinaires (OHO) de se développer. Selon Garcia Martin (2006), le séquençage du code génétique d'*Accumulibacter* révèle que cette bactérie, ou du moins la souche utilisée par ces auteurs, ne possède pas certains gènes clés dans la

voie métabolique Entner-Dudoroff (ED). Or cette voie est essentielle dans la dégradation du glycogène, qui est par ailleurs indispensable au métabolisme des OAP. Ainsi la croissance des OHO, qui pourrait effectuer la partie de la voie métabolique ED manquant à *Accumulibacter*, semble nécessaire pour réussir à développer un procédé EBPR efficace. Dès lors l'ajout d'une faible concentration d'acétate ou d'une autre source de matière organique au début de la phase aérobie pourrait permettre le développement d'une petite fraction d'OHO et ainsi améliorer les performances du procédé.

6.3 Perspectives

L'hypothèse de départ était que le procédé développé au Biodôme par réacteur séquentiel à lit mobile avec bac de concentrat devait permettre un enlèvement efficace des phosphates contenus dans l'eau grâce à un biofilm de bactéries déphosphatantes dénitrifiantes. Cette hypothèse n'a donc été que partiellement vérifiée. D'un point de vue fondamental, la possibilité d'effectuer une déphosphatation biologique sur une eau de mer sans calcium pourrait être intéressante pour vérifier l'impact du calcium sur le métabolisme des OAP. En revanche l'intérêt de l'application de telle recherche est relativement restreint dans la mesure où les circuits partiellement fermés en eau de mer ne sont pas très répandus et que pour ces systèmes, il ne sera pas envisageable de fabriquer de l'eau de mer sans calcium. En eau douce, plusieurs voies d'amélioration du procédé ont été identifiées dans la section précédente avec notamment l'addition d'éléments dans l'effluent synthétique à traiter, l'augmentation du ratio DCO/P ou l'addition d'une faible dose d'acétate dans la phase aérobie pour permettre à une fraction contrôlée d'OHO de se développer. Certaines de ces propositions sont actuellement en cours d'expérimentation par des étudiants en maîtrise à l'École Polytechnique de Montréal. Il faudra également garder à l'esprit lors de ces expériences que le fait que les OAG n'aient pas été identifiés lors du présent projet ne signifie pas qu'ils ne peuvent pas se développer dans ce procédé. Il faudra donc également surveiller

les paramètres environnementaux tel le pH et la température, et voir à maintenir un ratio DCO/P inférieur à 50 mg DCO/mg P et le pH élevé.

CHAPITRE 7

CONCLUSIONS

Ce projet de maîtrise visait à étudier la déphosphatation biologique par bactéries déphosphatantes dénitrifiantes à l'aide d'un réacteur à biofilm en lit mobile avec bac de concentrat. Il était prévu d'expérimenter le procédé en eau de mer en traitant l'eau de Saint-Laurent Marin, le mésocosme reproduisant le golfe du fleuve Saint-Laurent du Biodôme de Montréal. L'objectif principal de cette étude était de faire croître un biofilm déphosphatant dénitrifiant sans inoculum en eau de mer sur des supports synthétiques.

Une première étape a permis de modéliser le procédé sur le logiciel WEST afin d'en valider la faisabilité et de tester l'approche expérimentale envisagée à l'aide du modèle ASM3 et du module BioP de l'EAWAG. Cette modélisation a montré la possibilité de faire croître une biomasse déphosphatante dénitrifiante permettant d'atteindre une déphosphatation complète de l'eau du SLM en un cycle. Elle a également montré que la concentration en nitrates du SLM était telle que la masse de phosphore disponible n'était pas suffisante pour permettre une dénitrification importante de l'eau par ce seul procédé.

Une première expérience a été menée en eau de mer sur l'eau du Saint-Laurent Marin, où après avoir développé un biofilm dénitrifiant, une période d'enrichissement visait à obtenir un biofilm dénitrifiant déphosphatant. Malgré des conditions environnementales qui étaient favorables à la croissance des PAO, le biofilm déphosphatant n'a jamais pu être obtenu. La concentration élevée en calcium a été supposée comme facteur inhibiteur de l'activité de la biomasse.

Afin de valider la faisabilité du procédé, une deuxième série d'expériences a été réalisée avec un effluent synthétique en eau douce dont la concentration en phosphates était

proche de celles du SLM. Cette fois-ci un biofilm déphosphatant a été obtenu mais la dénitrification est restée marginale. La biomasse développée n'a permis d'obtenir qu'un rendement de 20% d'enlèvement de phosphates. Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer cette faible performance épuratoire comme une carence dans certains nutriments, une sélectivité trop forte du procédé pour les OAP ou un ratio DCO/P trop faible. L'optimisation de ce procédé par l'expérimentation de ces diverses hypothèses devrait être une suite logique à ce mémoire. D'autre part l'essai du procédé pour traiter un effluent d'eau douce réel permettrait également d'en expérimenter la faisabilité. Enfin la recherche d'une issue durable pour l'eau de concentrat enrichie en phosphates reste une question importante dont la réponse permettrait de faire de ce procédé un outil intéressant pour les piscicultures fonctionnant en circuit partiellement fermé.

RÉFÉRENCES

- Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., & Hirata, A. (2001). Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 442-446.
- Ahn, J., Schroeder, S., Beer, M., McIlroy, S., Bayly, R. C., May, J. W., et al. (2007). Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2257-2270.
- APHA, AWWA, & WEF. (1998). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (20th ed ed.). Washington, DC: American Public Health Agency, American Water Works Association and Water Environment Federation.
- Baetens, D., Vanrolleghem, P. A., Van Loosdrecht, M. C. M., & Hosten, L. H. (1999). Temperature effects in bio-p removal. *Water Science and Technology*, 39(1), 215-225.
- Barat, R., Montoya, T., Borrás, L., Seco, A., & Ferrer, J. (2006). Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*, 53(12), 29-37.
- Barker, P. S., & Dold, P. L. (1997). General model for biological nutrient removal activated-sludge systems: model presentation. *Water Environment Research*, 69(5), 969-984.

- Bortone, G., Saltarelli, R., Alonso, V., Sorm, R., Wanner, J., & Tilche, A. (1996). Biological anoxic phosphorus removal - the DEPHANOX process. *Water Science and Technology*, 34(1-2 pt 1), 119-128.
- Brandt, D., Sieker, C., & Hegemann, W. (2002). Combined denitrification and excess biological phosphorus removal in discontinuous operated biofilm systems. *Water Science and Technology*, 46(4-5), 193-200.
- Brdjanovic, D., Logemann, S., van Loosdrecht, M. C. M., Hooijmans, C. M., Alaerts, G. J., & Heijnen, J. J. (1998). Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies. *Water Research*, 32(4), 1035-1048.
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M. C. M., Hooijmans, C. M., Alaerts, G. J., & Heijnen, J. J. (1997). Temperature Effects on Physiology of Biological Phosphorus Removal. *Journal of Environmental Engineering*, 123(2), 144-153.
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255-1267.
- Cech, J. S., & Hartman, P. (1993). Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems. *Water Research*, 27(7), 1219-1225.
- Comeau, Y., Hall, K. J., Hancock, R. E. W., & Oldham, W. K. (1986). Biochemical model for Enhanced Biological Phosphorus Removal. *Water Research*, 20(12), 1511-1521.
- Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., et al. (2000). Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S

rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1175-1182.

Dae Sung, L., Che Ok, J., & Jong Moon, P. (2001). Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system. *Water Research*, 35(16), 3968-3976.

Dupla, M., Comeau, Y., Parent, S., Villemur, R., & Jolicoeur, M. (2006). Design optimization of a self-cleaning moving-bed bioreactor for seawater denitrification. *Water Research*, 40(2), 249-258.

Erdal, U. G., Erdal, Z. K., & Randall, C. W. (2003a). The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance. *Water Science and Technology*, 47(11), 1-8.

Erdal, U. G., Erdal, Z. K., & Randall, C. W. (2003b). A thermal adaptation of bacteria to cold temperatures in an enhanced biological phosphorus removal system. *Water Science and Technology*, 47(11), 123-128.

Filipe, C. D. M., & Daigger, G. T. (1999). Evaluation of the capacity of phosphorus-accumulating organisms to use nitrate and oxygen as final electron acceptors: A theoretical study on population dynamics. *Water Environment Research*, 71(6), 1140-1150.

Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., & Grady Jr, C. P. L. (2001). Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms. *Water Environment Research*, 73(2), 213-222.

- Garcia Martin, H., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K. W., McHardy, A. C., et al. (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1263-1269.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T., & Van Loosdrecht, M. (1999). Activated sludge model no. 3. *Water Science and Technology*, 39(1), 183-193.
- Helmer, C., & Kunst, S. (1998). Low temperature effects on phosphorus release and uptake by microorganisms in EBPR plants. *Water Science and Technology*, 37(4-5), 531-539.
- Helness, H., & Odegaard, H. (1999). Biological phosphorus removal in a sequencing batch moving bed biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 40(4-5), 161-168.
- Intrasungkha, N., Keller, J., & Blackall, L. L. (1999). Biological nutrient removal efficiency in treatment of saline wastewater. *Water Science and Technology*, 39(6), 183-190.
- Kern-Jespersen, J. P., Henze, M., & Strube, R. (1994). Biological phosphorus release and uptake under alternating anaerobic and anoxic conditions in a fixed-film reactor. *Water Research*, 28(5), 1253-1255.
- Koch, G., Kuhni, M., Gujer, W., & Siegrist, H. (2000). Calibration and validation of Activated Sludge Model No. 3 for Swiss municipal wastewater. *Water Research*, 34(14), 3580-3590.
- Kuba, T., Murnleitner, E., van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1996). Metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(6), 685-695.

Labbé, N., Parent, S., & Villemur, R. (2003). Addition of trace metals increases denitrification rate in closed marine systems. *Water Research*, 37(4), 914-920.

Labbé, N., Parent, S., & Villemur, R. (2004). *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 1), 269-273.

Labelle, M.-A., Juteau, P., Jolicoeur, M., Villemur, R., Parent, S., & Comeau, Y. (2005). Seawater denitrification in a closed mesocosm by a submerged moving bed biofilm reactor. *Water Research*, 39(14), 3409-3417.

Liu, Y., Lin, Y.-M., & Tay, J.-H. (2005). The elemental compositions of P-accumulating microbial granules developed in sequencing batch reactors. *Process Biochemistry*, 40(10), 3258-3262.

Martin Martin, M. A., Lopez Enriquez, L., Fernandez-Polanco, M., Villaverde, S., & Garcia-Encina, P. A. (2007). Nutrients removal in hybrid fluidised bed bioreactors operated with aeration cycles. *Water Science and Technology*, 55(8-9), 51-58.

Metcalf, & Eddy. (2003). Fundamentals of Biological Treatment. In McGraw-Hill (Ed.), *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse, Fourth edition* (pp. 545-657). New-York: McGraw-Hill.

Mino, T., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research*, 32(11), 3193-3207.

Oehmen, A., Lemos, P. C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L. L., et al. (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research*, 41(11), 2271-2300.

- Oehmen, A., Vives, M. T., Lu, H., Yuan, Z., & Keller, J. (2005). The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Research*, 39(15), 3727-3737.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. L., & Keller, J. (2005). Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(2), 162-168.
- Panswad, T., & Anan, C. (1999). Impact of high chloride wastewater on an anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimated seeds. *Water Research*, 33(5), 1165-1172.
- Pastorelli, G., Canziani, R., Pedrazzi, L., & Rozzi, A. (1999). Phosphorus and nitrogen removal in moving-bed sequencing batch biofilm reactors. *Water Science and Technology*, 40(4-5), 169-176.
- Pattarkine, V. M., & Randall, C. W. (1999). Requirement of metal cations for enhanced biological phosphorus removal by activated sludge. *Water Science and Technology*, 40(2), 159-165.
- Randall, A. A., & Liu, Y.-H. (2002). Polyhydroxyalkanoates form potentially a key aspect of aerobic phosphorus uptake in enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*, 36(14), 3473-3478.
- Rickard, L. F., & McClintock, S. A. (1992). Potassium and magnesium requirements for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Water Science and Technology*, 26(9-11), 2203-2206.
- Rieger, L., Koch, G., Kuhni, M., Gujer, W., & Siegrist, H. (2001). The EAWAG Bio-P module for activated sludge model No. 3. *Water Research*, 35(16), 3887-3903.

Rogalla, F., Johnson, T. L., & McQuarrie, J. (2006). Fixed film phosphorus removal - Flexible enough? *Water Science and Technology*, 53(12), 75-81.

Schonborn, C., Bauer, H. D., & Roske, I. (2001). Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules. *Water Research*, 35(13), 3190-3196.

Smolders, G. J. F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1994). Stoichiometric Model of the Aerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 837-848.

Spagni, A., Stante, L., & Bortone, G. (2001). Selection of Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms in Activated Sludge. *Environmental Technology*, 22, 1429-1437.